

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی قزوین

دانشکده پزشکی شهید بابایی

هوالشافی

جلسه دفاع از پایان نامه جهت اخذ دکترای حرفه ای پزشکی

اثرات کوئرتستین بر بیان ژن های ساب یونیت های گیرنده های ایونوتروپیک گلوتامات

(NR2B،NR2A) در تشنج ناشی از کاینیک اسید در موش

استاد مشاور

استاد راهنما

دکتر مرجان نصیری اصل

دکتر سحر مقبلی نژاد

نگارش: آرمان رحیمی محسنی

پاییز ۹۴

شماره پایان نامه

فصل اول

کلیات و مبانی نظری تحقیق ۵-۳۷

فصل دوم

مرور و بررسی متون ۴۲-۳۹

فصل سوم

مواد و روش کار ۵۴-۴۳

فصل چهارم

یافته‌ها و نتایج ۵۹-۵۵

فصل پنجم

بحث و نتیجه‌گیری ۶۵-۶۰

فصل ششم

فهرست منابع ۷۳-۶۶

چکیده

در سال های اخیر، فلاونوئیدها با یک اثر مهم بیولوژیکی شناخته شده اند. کوئرستین به عنوان یک فلاونوئید دارای خواص دارویی از جمله ضد التهاب، و فعالیت های محافظت نوروئی و اثر ضد تشنج می باشد.

هدف از این مطالعه بررسی نقش کوئرستین در بیان ژن زیر واحد Ionotropic گیرنده گلوتامات در تشنج ناشی از کاینیک اسید در موش بود. بدین منظور کورستین (50 و 100 mg / kg) به مدت 7 روز قبل از شروع تزریق (Kinic acid KA) به موشها داده شد.

نتایج نشان داد پیش درمانی کورستین (100 میلی گرم / کیلوگرم) به مدت 7 روز می تواند به طور قابل توجهی افزایش بیان ژن زیر واحد NR2A و زیر واحد NR2B نسبت به گروه کنترل و گروه KA در هیپوکامپ موش نشان دهد به طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد افزایش بیان ژن از زیرواحدهای گیرنده های NMDA توسط کوئرستین ممکن است اثر محافظتی آن در شکل پذیری سیناپسی و حافظه را توضیح دهد. با این حال، مطالعات مولکولی آینده نیاز به بررسی اثرات کورستین در برابر نورو توکسیسته KA دارد.

فصل اول

کلیات و مبانی نظری تحقیق

اختلالات عصبی، دسته ای از بیماری های مهم را در علم پزشکی تشکیل می دهند که تشخیص به موقع و درمان مناسب آنها، رابطه ی کاملاً مستقیمی با زندگی بیمار داشته و این تشخیص و درمان مناسب، به کاهش چشم گیر عوارض ناشی از بیماری های عصبی کمک قابل توجهی می نماید و می تواند بیمار را به سطح مطلوبی از زندگی بازگرداند. دسته ای از این بیماری ها، تشنج و انواع مختلف آن می باشد که با شیوع نسبتاً زیادی در افراد جامعه اتفاق می افتد و شناسایی به موقع و درمان صحیح آنها، نقش قابل توجهی در بهبود وضعیت زندگی بیمار و کاهش عوارض ناشی از این بیماری ایفا می نماید (۱).

۱-۱ از دست رفتن موقت آگاهی

هنگامی که عملکرد نیمکره های مغزی^۱ یا سیستم فعال کننده ی شبکه ای^۲ در ساقه مغز دچار اختلال شود، هوشیاری^۳ از دست می رود. اختلال عملکرد دوره ای در این نواحی آناتومیک موجب فقدان گذرا و اغلب عودکننده ی هوشیاری می گردد که این فقدان دوره ای هوشیاری دو علت عمده دارد؛ تشنج و سنکوپ (۱).

۱-۱-۱ تشنج

اختلالی است که مشخصه آن علائم و نشانه های موقت عصبی ناشی از فعالیت الکتریکی غیرطبیعی، حمله ای و بسیار هماهنگ نورون های قشر مغز می باشد (۱).

۱-۱-۲ سنکوپ

سنکوپ^۴ یا غش کردن نوعی کاهش سطح هوشیاری به علت اختلال در تغذیه خونی (جریان خون) نیمکره های مغزی یا ساقه مغز می باشد. سنکوپ می تواند از کاهش خورسانی سراسری مغز در اثر رفلکس وازوواگال، هیپوتانسیون ارتواستاتیک یا کاهش برون ده قلبی منشا گرفته باشد یا ناشی از کاهش خورسانی انتخابی ساقه مغز در اثر ایسکمی ورتیروبازیلار^۵ باشد (۱).

^۱ Cerebral Hemispheres

^۲ Reticular Activating System

^۳ consciousness

^۴ Syncope

^۵ Vertebro-Basilar

۱-۲ افتراق

گام اول در ارزیابی بیماری که دچار کاهش هوشیاری شده، مشخص کردن شرایط بروز حمله یا علائم و نشانه های همراه و تعیین این مطلب است که آیا حمله ناشی از بیماری نیازمند توجه فوری مانند هیپوگلیسمی، منژیت، ترومای سر، آریتمی قلبی یا آمبولی های حاد ریه است یا خیر. تعداد حملات و نیز شباهت و عدم شباهت آنها باید مشخص گردد. اگر تمامی حملات مشابه بوده باشند، می توان به یک روند پاتوفیزیولوژیک منفرد فکر کرد و وجوه افتراق آنها را تعیین نمود (۱).

علائم شروع حمله.

۱-۲-۱ علائم پیش درآمد (اورا)^۱

باید همیشه شرح حال کاملی از علائم پیش درآمد و نشانه های اولیه به دست آورد. اغلب وجود نشانه های گذرا و کلیشه ای در شروع برخی از انواع تشنج می تواند محل اختلال مسبب تشنج را در سیستم عصبی مرکزی مشخص کند. البته باید به این نکته توجه داشت که شاید در یک فرد خاص بیش از یک اورا رخ دهد (۱).

۱-۲-۲ وضعیت بیمار به هنگام وقوع کاهش هوشیاری

هیپوتانسیون و غش ساده در حالت ایستاده و یا نشسته اتفاق می افتد. حملاتی که در حالت خوابیده نیز (یا فقط در حالت خوابیده) اتفاق می افتند، مطرح کننده ی تشنج یا آریتمی قلبی به عنوان علت است (۱).

۱-۲-۳ ارتباط مشکل با فعالیت جسمانی

سنگوپ همراه با فعالیت جسمانی معمولا به دلیل انسداد در خروجی قلب (مثل تنگی آئورت، کاردیومیوپاتی هیپرتروفیک انسدادی و میکسوم دهلیزی) یا آریتمی قلبی است (۱).

۱-۲-۴ علائم حرکتی یا حسی موضعی

¹ Aura

پدیده های حرکتی یا حسی موضعی (مثل پرش بی اختیار یک دست، بی حسی نیمه صورت، چرخش اجباری سر) مطرح کننده ی تشنجی است که از قشر پیشانی-آهیانه ای (فرونتوپریئیتال) سمت مقابل منشا می گیرد (۱).

۵-۲-۱ علائم عاطفی یا شناختی

احساس ترس، توهم بویایی یا چشایی یا احساس احشایی یا آشنا پنداری^۱ اغلب با تشنج حاصل از منشا لوب گیجگاهی (تمپورال) همراه می باشند (۱).

علائم قبل از سنکوپ

گیجی و منگی پیشرونده همراه با تاری دید و احساس غش کردن که نشان دهنده ی اختلال عملکرد منتشر مغزی است، با کاهش جریان خون مغزی (مثلا غش ساده، آریتمی قلبی، هیپوتانسیون ارتواستاتیک) همراهند (۱).

رویداد های زمان حمله

۱-۳-۱ سفتی تونیک و حرکات کلونیک

تشنج تونیک-کلونیک عمومی (صرع بزرگ یا صرع حرکتی بزرگ) با کاهش هوشیاری همراه بوده و به صورت سفت شدن تونیک و سپس حرکات کلونیک (پرش) انتهاها مشخص می شود (۱).

۲-۳-۱ سفتی مختصر یا حرکات پرشی

کاهش خونرسانی مغزی می تواند موجب سفتی یا حرکات پرشی شود، بویژه اگر به دلیل جلوگیری از سقوط و قرار گرفتن در حالت دراز کش هیپوپرفیوژن تشدید شود. این پدیده گاهی سنکوپ تشنجی^۲ نامیده می شود. چنین رویدادی در گردش خون خودمحدودشونده بوده و نیاز به درمان ضد تشنجی ندارد. از دست رفتن هوشیاری در اثر هیپوپرفیوژن، به ندرت بیش از ۱۰ تا ۲۰ ثانیه طول می کشد و با کنفیوزیون پس از حمله ای همراه نیست، مگر اینکه ایسکمی طولانی و شدید مغزی اتفاق افتاده باشد (۱).

^۱ Deja vu

^۲ Convulsive Syncope

پدیده های بعد از حمله

۱-۴-۱ بهبودی فوری هوشیاری

بهبودی از یک حمله غش ساده با برگشت فوری هوشیاری و روشنی ذهن در عرض ۲۰ تا ۳۰ ثانیه مشخص می شود (۱).

۱-۴-۲ کنفیوزیون کوتاه

دوره کنفیوزیون، عدم شناخت زمان و مکان یا آژیتاسیون به بدنبال صرع ژنرالیزه ی تونیک کلونیک اتفاق می افتد. معمولاً دوره ی کنفیوزیون کوتاه است و فقط برای دقایقی طول می کشد. هرچند چنین رفتاری برای افراد ناظر آشکار است اما ممکن است بیمار آن را به خاطر نیاورد (۱).

۱-۴-۳ کنفیوزیون طولانی

ممکن است اختلال طولانی هوشیاری (حالت پس حمله ای^۱ طولانی) بدنبال حالت صرعی مداوم^۲ ایجاد شود. همچنین ممکن است در نزد بیماران مبتلا به بیماری ساختمانی منتشر در مغز (مثل دمانس، آنسفالیت) یا آنسفالوپاتی متابولیک پس از یک تشنج منفرد نیز رخ دهد (۱).

۱-۴-۴ گاز گرفتگی زبان

گاز گرفتن قسمت طرفی زبان قویاً به نفع تشنج تونیک-کلونیک است و ممکن است بیمار پس از حمله متوجه آن شود (۱).

۱-۴-۵ بی اختیاری ادرار

پس از به دست آوردن هوشیاری، بیمار ممکن است متوجه بی اختیاری ادرارش شود، اما این امر می تواند طی تشنج یا سنکوپ رخ دهد. بی اختیاری مدفوع شایع نیست (۱).

^۱ Postictal

^۲ Status Epilepticus

۲ تشنج

تشنج اختلال موقت عملکرد مغزی در اثر فعایت الکتریکی غیر طبیعی نورونی است. صرع^۱، گروهی از اختلالات شایع است که با تشنجات مکرر مشخص می شوند و علت شایع کاهش هوشیاری دوره ای است. شیوع صرع در جمعیت عمومی تقریباً ۱٪ است و احتمال بروز آن در طول عمر تقریباً ۱۰٪ می باشد (۱).

بیماری که به صورت فعال تشنج می کند یا به عنوان یک فرد مبتلا به صرع شناخته می شود، از نظر تشخیصی مشکلی ندارد. از آنجا که بسیاری از تشنجات در خارج از بیمارستان اتفاق می افتد و توسط پرسنل پزشکی مشاهده نمی شوند، معمولاً می توان به صورت عقب نگر^۲ و از روی شرح حال زمان واقعه آن را تشخیص داد. دو مشخصه موجود در شرح حال که بیشتر نشان دهنده صرع هستند عبارتند از: اورا؛ که همراه با تشنجات کانونی رخ می دهد و حالت کنفیوزیونی پس از حمله ی تشنج؛ که بدنبال تشنج تونیک-کلونیک دیده می شود (۱).

۱-۲ اتیولوژی

ممکن است تشنج ها ناشی از اختلال عملکرد اولیه سیستم عصبی یا اختلال متابولیک زمینه ای یا بیماری سیستمیک باشند. تشخیص این انواع از یکدیگر حیاتی می باشد، چرا که باید درمان را بر اساس اختلال زمینه ای انتخاب نمود. فهرستی از بیماری های نورولوژیک و سیستمیک که موجب تشنج می شوند، در جدول زیر (جدول ۱) آورده شده اند (۱):

¹ Epilepsy

² Retrospectively

بیماری های نورولوژیک اولیه	<p>تشنج خوش خیم ناشی از تب در کودکان</p> <p>صرع ایدیوپاتیک/کریپتوژنیک</p> <p>دیس ژنزی مغزی</p> <p>صرع ناشی از بیماری</p> <p>ترومای سر</p> <p>سکته مغزی یا مالفورمسیون عروقی</p> <p>ضایعات توده ای</p> <p>عفونت های سیستم عصبی مرکزی (مننژیت یا آنسفالیت، سیستم سرکوزیس، آنسفالوپاتی ناشی از ایدز)</p>
بیماری های سیستمیک	<p>هیپوگلیسمی</p> <p>هیپوناترمی</p> <p>حالات هیپراسمولار</p> <p>هیپوکلسمی</p> <p>اورمی</p> <p>آنسفالوپاتی کبدی</p> <p>پورفیری</p> <p>مصرف بیش از حد دارو/قطع دارو</p> <p>هیپرترمی</p> <p>ایسکمی سراسری مغز</p> <p>آنسفالوپاتی هیپرتانسیو</p> <p>اکلامپسی</p>

جدول ۱. بیماری های نورولوژیک و سیستمیک مسبب تشنج.

نقش عوامل ژنتیکی در صرع و پاسخ صرع به درمان امری پیچیده است. یک سندرم صرعی منفرد (مثل صرع میوکلونیک جوانان) می تواند ناشی از جهش در چند ژن متفاوت باشد و برعکس، جهش های یک ژن منفرد، می تواند مسئول فنوتیپ های مختلف صرع باشد. ژن هایی که سبب استعداد ابتلا به صرع می شوند عبارتند از (۱):

ژن های کد کننده ی کانال های سدیم، کلسیم، پتاسیم و کلر؛ ژن های کد کننده ی گیرنده های نیکوتینیک کولینرژیک، گاما آمینو بوتیریک اسید (GABA) و G protein-coupled و آنزیم ها هستند.

۱-۱-۲ بیماری های نورولوژیک اولیه

تشنج خوش خیم ناشی از تب^۱

این نوع تشنج در ۲٪ تا ۵٪ کودکان ۶ ماهه تا ۵ ساله و معمولاً در اولین روز یک بیماری تب دار (با دمای بدنی بیشتر از ۳۸ درجه سانتی گراد یا ۱۰۰/۴ درجه فارنهایت) و در غیاب هر نوع عفونت سیستم اعصاب مرکزی (چون مننژیت و آنسفالیت) اتفاق می افتد (۱).

ممکن است سابقه فامیلی تشنج خوش خیم ناشی از تب یا سایر انواع تشنج موجود داشته باشد. چند جهش در ارتباط با تشنج های ناشی از تب شناسایی شده اند که عبارت اند از (۱):

گیرنده ی متصل به G پروتئین MASS1، اینوزیتول مونوفسفاتاز SCN1A، IMPA2، SCN1B و ساب یونیت های کانال سدیم SCN2A، KCNQ2، KCNQ3 و ساب یونیت های کانال پتاسیم KCNA1 و GABRG2 و ساب یونیت های گیدنده ی GABA.

تشنج خوش خیم ناشی از تب معمولاً کمتر از ۱۵-۱۰ دقیقه طول می کشد و فاقد ویژگی های موضعی است. حدود دو سوم بیماران یک تشنج را تجربه می کنند و کمتر از یک دهم آنها بیش از سه بار تشنج می کنند. در کودکان با سن کمتر از ۱۸ ماه یا در کودکانی که سابقه خانوادگی تشنج ناشی از تب را دارند، تشنج در همان ساعت اول افزایش درجه حرارت اتفاق افتاده و خطر عود آن بیشتر است؛ ۹۰٪ موارد عود در دو سال

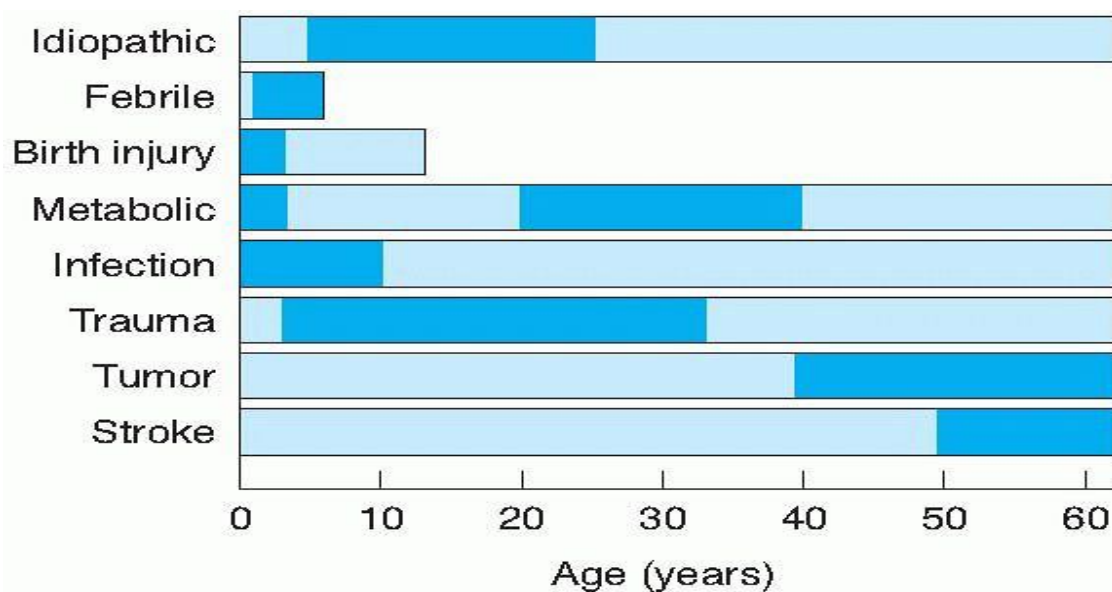
¹ Benign Febrile Convulsion

اول بعد از اولین تشنج روی می دهند. از آنجا که تشنج ناشی از تب خود محدودشونده است، اغلب نیازی به درمان ندارد (۱).

احتمال پیدایش تشنج مزمن ۶-۲٪ است و در بیماران مبتلا به اختلالات پایدار نورولوژیک، تشنج های طولانی، موضعی یا متعدد، یا سابقه فامیلی تشنج های غیر تب دار بیشترین میزان عود دیده می شود (۱).

تشنج ایدیوپاتیک (کریپتوژنیک)

این موارد دو سوم تشنج های جدید را در جمعیت عمومی تشکیل می دهد. طیف سنی ابتلا گسترده است و از دهه دوم تا هفتم می باشد (مطابق شکل ۱) (۱).



شکل ۱. طیف سنی ابتلا به تشنج و علت شایع در هر بازه سنی.

خطر عود در ۵ سال بعد از اولین تشنج بدون تحریک، ۳۵٪ است. دومین تشنج خطر عود را تا ۷۵٪ افزایش می دهد. اکثر عود ها در سال اول می باشد. ژن هایی که در صرع ژنرالیزه ایدیوپاتیک درگیرند عبارتند از (۱):

آنزیم وابسته به NAD میتوکندریایی، ME2 و ساب یونیت های کانال کلسیم CACNB4 و CACNA1A.

تروما به سر

تروما به سر یک علت شایع صرع است به ویژه هنگامی که تروما در دوران پری ناتال بوده و با شکستگی فرورونده^۱ جمجمه یا هماتوم داخل مغزی یا ساب دورال همراه باشد. با این وجود، تشنج هایی که در یک هفته اول پس از ترومای غیرنافذ به سر اتفاق می افتند نشان دهنده ی امکان وقوع تشنج مزمن نیستند. اگرچه بیمارانی که دچار ترومای جدی سر شده اند اغلب با داروهای ضدتشنجی تحت درمان پیشگیرانه قرار می گیرند (۱).

سکته

سکته^۲ اگر قشر مغز را درگیر کند، موجب بروز تشنج در ۵٪ تا ۱۵٪ بیماران می شود و ممکن است متعاقب انفارکتوس ترومبوتیک یا آمبولیک یا هموراژیک اتفاق بیفتد. همانند ترومای سر، تشنج زودهنگام لزوماً نشان دهنده ی صرع مزمن نیست و درمان دراز مدت لازم نمی باشد. مالفورماسیون های عروقی حتی بدون پارگی می توانند با تشنج همراه باشند که احتمالاً در نتیجه اثر تحرکی آنها بر بافت های همجوار در مغز می باشد (۱).

ضایعات توده ای

ضایعات توده ای همانند تومور مغزی یا آبسه ها می توانند با تشنج تظاهر کنند. گلیوبلاستوم ها^۳، آستروسیتوم ها^۴ و مننژیوم ها^۵ شایعترین تومورهای همراه با تشنج هستند که منعکس کننده شیوع زیاد آنها در میان تومورهای مبتلا کننده ی نیکره های مغزی است (۱).

¹ Depressed Fracture

² Stroke

³ Glioblastomas

⁴ Astrocytomas

⁵ Meningiomas

منژیت یا انسفالیت

عفونت های باکتریایی (همچون هموفیلوس آنفولانزا و سل)، ویروس ها (همچون هرپس ساده)، قارچ ها یا انگل ها (مثل سیستی سرکوز) نیز می توانند موجب تشنج شوند (۱)

آنومالی های تکاملی

دیس ژنزی قشری (کورتیکال) و اختلالات مهاجرت نورونی هم زمینه ساز صرع هستند (۱).

۲-۱-۲ اختلالات سیستمیک

اختلالات متابولیک و سایر بیماری های سیستمیک از جمله سندروم های ناشی از دوز زیاد داروها و قطع دارو، می توانند با تشنجی همراه باشند که در صورت اصلاح اختلال زمینه ای، برطرف می شوند. در این موارد بیمار را نباید به عنوان بیمار مبتلا به صرع در نظر گرفت (۱).

هیپوگلیسمی

کاهش قند خون به خصوص به مقادیر کمتر از ۲۰-۳۰ میلی گرم در دسی لیتر، می تواند موجب تشنج گردد اما تظاهرات نورولوژیک به میزان سرعت سقوط گلوکز بستگی دارد (۱).

هیپوناترمی

در مقادیر کمتر از ۱۲۰ میلی اکی والان در لیتر میتواند با تشنج همراه باشد. اگر سرعت سقوط سریع باشد، در مقادیر بالاتر از ۱۲۰ نیز می تواند مسبب تشنج باشد (۱).

حالات هیپراسمولار

از جمله هیپرگلیسمی غیرکتونی هیپراسمولار و هیپرناترمی در صورتیکه اسمولاریته سرم به بیش از ۳۳۰ میلی اسمول در لیتر افزایش یابد، می تواند منجر به بروز تشنج گردد (۱).

هیپوکلسمی

با سطح سرمی کلسیم در بازه ۴/۳ تا ۹/۲ میلی گرم در دسی لیتر می تواند منجر به تشنج با یا بدون تتانی^۱ شود (۱).

اورمی

اورمی^۲ نیز می تواند موجب بروز تشنج شود و به خصوص در مواردی است که به سرعت ایجاد شود (۱).

انسفالوپاتی کبدی

گاه با تشنج چندکانونی یا ژنرالیزه همراه است (۱).

پورفیری^۳

اختلال در بیوسنتز هم^۴ می باشد که موجب نوروپاتی و تشنج می شود. ممکن است درمان تشنج دشوار باشد، زیرا بسیاری از داروهای ضد تشنج موجب تشدید بیماری می شوند (۱).

مصرف بیش از حد دارو

می توند موجب تشدید صرع یا بروز تشنج در بیماران غیر صرعی شود. تشنج تونیک-کلونیک ژنرالیزه، شایعترین نوع است اما تشنج های موضعی یا چند کانونی نیز اتفاق می افتند. داروهایی که مصرف بیش از حد مجاز آنها اغلب سبب بروز تشنج می شوند، عبارتند از: ضدافسردگی ها، آنتی سایکوتیک ها، کوکائین، انسولین، لیدوکائین و متیل گزانتین ها (جدول ۲)(۱).

آنتی بیوتیک ها	کینولون ها، ایزونیاژید، پنی سیلین ها
آنتی کولین استراز ها	فسفات ارگانیک، فیزوستیگمین
ضد افسردگی ها	یک حلقه ای، سه حلقه ای، هتروسیکلیک، مهارکننده های انتخابی بازجذب سروتونین
آنتی سایکوتیک ها	فنوتیازین ها، بوتیروفنون ها، کلوزاپین

¹ Tetany

² Uremia

³ Porphyria

⁴ Heme

داروهای شیمی درمانی	اتوپوزاید، ایفوسفامید، سیس پلاتین
داروهای هیپوگلیسمیک	انسولین
بی حس کننده های موضعی	بوپیواکائین، لیدوکائین، پروکائین، اتیدوکائین
متیل گزانتین ها	آمینوفیلین، تتوفیلین
ضد دردهای مخدر	فنتانیل، میریدین، پنتازوسین، پروپوکسی فن
سمپاتومیمتیک ها	آمفتامین، کوکائین، افدرین، فنیل پروپانولامین، تربوتالین
سایر موارد	آنتی هیستامین ها، محلول های هیپراسمولار وریدی، لیتیوم، فن سیکلیدین

جدول ۲. فهرست داروهایی که مصرف بیش از حد آنها، اغلب سبب بروز تشنج می گردد.

قطع دارو

قطع برخی از داروها به ویژه قطع مصرف اتانول و داروهای آرامبخش می تواند با یک یا چند تشنج ژنرالیزه تونیک-کلونیک همراه شود که معمولا خود به خود برطرف می شوند. در ۹۰٪ موارد، تشنج ناشی از قطع مصرف الکل به طور معمول ۴۸ ساعت پس از کاهش یا قطع مصرف الکل اتفاق می افتد و با حملات کوتاه (۶-۱ حمله) که در مدت ۱۲ ساعت برطرف می شود، مشخص می گردد (۱).

قطع مصرف ناگهانی داروهای آرام بخش می تواند موجب تشنج در افرادی شود که به طور معمول بیش از ۸۰۰-۶۰۰ میلی گرم در روز سکوباربیتال یا دوز های معمولی از سایر آرام بخش های کوتاه اثر مصرف می کنند. به طور تیپیک، تشنج ناشی از قطع داروهای آرام بخش ۴-۲ ساعت پس از قطع دارو اتفاق می افتد اما ممکن است تا حداکثر یک هفته به تعویق بیفتد. تشنج های موضعی به ندرت بدنبال قطع مصرف الکل یا داروهای آرام بخش اتفاق می افتند؛ این تشنج ها بیانگر یک ضایعه موضعی دیگر مغز هستند که نیازمند ارزیابی است (۱).

ایسکمی سراسری مغز

می تواند ناشی از ایست قلبی، آریتمی های قلبی یا هیپوتانسیون باشد که بدنبال ایجاد اسکمی سراسری مغز ممکن است چند حرکت تونیک یا تونیک-کلونیک ایجاد شود که به تشنج شباهت دارد، اما احتمالاً این حرکات نشاندهنده ی فعالیت غیر طبیعی ساقه مغز است. همچنین ایسکمی سراسری می تواند با میوکلونوس خودبخودی همراه شود، یا پس از برگشتن هوشیاری، با میوکلونوس ناشی از حرکت همراه گردد. تشنج نسبی یا تونیک-کلونیک ژنرالیزه نیز اتفاق می افتد؛ این تشنج ها می توانند بصورت حرکات خفیف صورت و چشم ها بروز کنند و باید تحت درمان قرار بگیرند. با این وجود، تشنج های منفرد متعاقب ایسکمی سراسری مغز لزوماً به معنی عاقبت نامطلوب نیست (۱).

انسفالوپاتی هیپرتانسیو

می تواند با تشنج ناکامل یا با تشنج تونیک-کلونیک ژنرالیزه همراه باشد (۱).

اکلامپسی

به بروز تشنج یا کما در بیماران باردار مبتلا به هیپرتانسیون، پرتئینوری و ادم (پره اکلامپسی) اطلاق می شود. مانند انسفالوپاتی هیپرتانسیو در بیماران غیر باردار، ادم مغزی، ایسکمی و خونریزی می تواند به عوارض نورولوژیک منجر شود (۱).

هیپرترمی

می تواند در اثر عفونت ، تماس با گرما، ضایعات هیپوتالاموس یا داروهای نظیر فن سیکلیدین و همچنین داروهای آنتی کولینرژیک یا نورولپتیک (سندروم نورولپتیک بدخیم) و داروهای استنشاقی بیهوشی و بلوک کننده های عصبی-عضلانی باشد. ویژگی بالینی هیپرترمی شدید (درجه حرارت ۴۲ درجه سانتی گراد یا ۱۰۷ درجه فارنهایت) شامل تشنج، حالت کنفیوزیون یا کما، شوک و نارسایی کلیه است. درمان با داروهای ضد تب یا خنک کردن مصنوعی برای کاهش درجه حرارت به ۳۹ درجه سانتی گراد یا ۱۰۲ درجه فارنهایت، داروهای

ضدتشنج و دیگر درمان های اختصاصی (مثل آنتی بیوتیک برای عفونت؛ دانترلن برای هیپرترمی بدخیم) در صورت اندیکاسیون باید انجام شوند (۱).

۳-۱-۲ تشنج های کاذب

حملاتی که به تشنج شباهت دارند (نشنج کاذب^۱ یا روانزاد^۲) ممکن است تظاهراتی از اختلالات روانی نظیر بیماری های تبدیلی، بیماری های سوماتیزاسیون، اختلالات ساختگی با نشانه های فیزیکی یا تمارض^۳ باشد (۱).

معمولا تشنج های کاذب را می توان هم از نظر بالینی و هم در یافته های نوار مغزی باز شناخت. در بیماران مبتلا به تشنج کاذب که شبیه به حملات تونیک-کلونیک است، ممکن است قبل از حمله علائم هشدار دهنده نیز وجود داشته باشند؛ معمولا فاز تونیک وجود ندارد و فاز کلونیک شامل حرکات شدید اندام هاست که در جریان آن بیمار به ندرت به خود آسیب رسانده یا دچار بی اختیاری می شود. بستن حمله ای چشم ها نیز شایع است. در برخی موارد، حرکات غیر طبیعی همه ی اندام ها بدون از دست رفتن هوشیاری مشاهده می شود؛ در موارد دیگر طی فقدان هوشیاری، فریاد یا حرکتی وجود دارد که هدف خاصی را دنبال می کند. کنفیوزیون پس از حمله وجود ندارد و علائم فیزیکی غیرطبیعی پس از حمله مشاهده نمی شود. اگر در جریان حمله نوار مغزی اخذ شود، فعالیت تشنجی نشان نمی دهد و پس از حمله نیز کاهش سرعت امواج دیده نمی شود (۱)

۲-۲ طبقه بندی و ویژگی های بالینی

۱-۲-۲ تشنج های ژنرالیزه

تونیک-کلونیک (صرع بزرگ)

آبسانس (صرع کوچک)

سایر انواع (تونیک، کلونیک، میوکلونیک، میوکلونیک-جوانی و بقیه)

^۱ Pseudoseizure

^۲ Psychogenic Seizure

^۳ Malingering

۲-۲-۲ تشنج های کانونی (ناکامل)

کانونی ساده

کانونی مرکب (لوب تمپورال، پسیکوموتور)

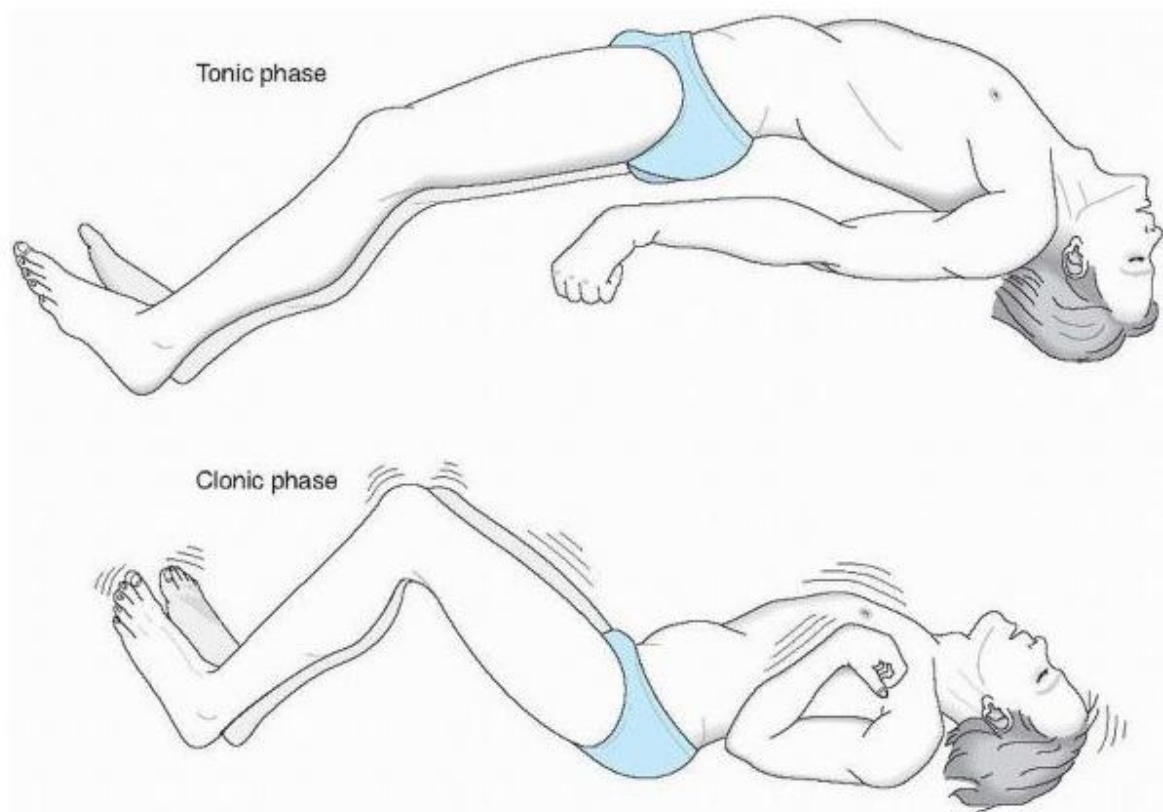
تشنج کانونی با فراگیری ژنرالیزه

۲-۲-۱ تشنج های ژنرالیزه

تشنج های فراگیر تونیک - کلونیک

تشنج های فراگیر تونیک-کلونیک حملاتی هستند که در آنها هوشیاری از دست می رود و معمولاً فاقد اورا یا سایر علائم هشدار دهنده هستند. در صورتی که علائم هشدار دهنده وجود داشته باشد، معمولاً نشانه هایی غیر اختصاصی هستند (۱).

(۱) فاز تونیک: تظاهرات اولیه شامل عدم هوشیاری و انقباضات تونیک عضلات اندام ها به مدت ۱۰ تا ۳۰ ثانیه است که در ابتدا موجب فلکسیون و سپس اکستانسیون به ویژه در عضلات پشت و گردن می شود (همانند شکل (۲)(۱)).



شکل ۲. شمایی از حالت فلکسیون و اکستانسیون در هنگام تشنج فراگیر تونیک-کلونیک.

انقباض تونیک عضلات تنفسی می تواند موجب صدایی در بازدم (گریه یا حالت ناله) و سیانوز گردد و انقباض عضلات جونده می تواند منجر به ترومای زبان شود. بیمار به زمین می افتد و احتمال دارد که در حین سقوط دچار آسیب شود (۱).

۲) فاز کلونیک: پس از فاز تونیک، فاز کلونیک آغاز می شود که شامل انقباض و شل شدن متناوب عضلات همراه با پرش قرینه اندام هاست که به مدت ۳۰ تا ۶۰ ثانیه یا بیشتر ادامه می یابد. پس از خاتمه فاز تونیک، تلاش برای تنفس سریعاً از سر گرفته می شود و سیانوز برطرف می گردد. ممکن است دهان از بزاق پر شود. با

گذشت زمان، تکان ها کمتر شده تا سرانجام همه حرکات متوقف می شود و عضلات به حالت شل در می آیند. شل شدن اسفگتر یا انقباض عضلات دترسور مثانه می تواند موجب بی اختیاری ادراری شود (۱).

۳) بهبودی: همچنان که بیمار هوشیاری خود را باز می یابد کنفیوزیون پس حمله ای و اغلب سردرد بروز می کند. موقعیت یابی^۱ کامل معمولا پس از ۱۰ تا ۳۰ دقیقه یا حتی در بیماران نبتلا به صرع مداوم یا اختلال ساختمانی و متابولیک مغزی دیرتر باز می گردد. در تشنج های با منشا صرع ایدیوپاتیک یا متابولیک، معمولا معاینه فیزیکی در حالت پس حمله ای طبیعی است به استثنا اینکه ممکن است رفلکس کف پایی به صورت گذرا به حالت اکستانسوری (علامت بابنسکی) دیده شود. مرمک ها حتی در شرایطی که بیمار هوشیار نیست، به نور پاسخ می دهند (۱).

۴) حالت صرعی مداوم: صرع مداوم یا پایدار^۱ به نوعی از حملات صرعی گفته می شود که بیش از ۳۰ دقیقه طول بکشند، بدون اینکه به صورت خودبخودی متوقف شوند، یا اینکه به حدی عود کنند که در فاصله زمانی میان حملات، هوشیاری باز نگردد. صرع پایدار یک اورژانس طبی است، زیرا در صورتیکه درمان نشود می تواند موجب آسیب دائمی مغز، هیپرپیرکسی و کلاپس گردش خون شود (۱).

تشنج های آبنانس (صرع کوچک)

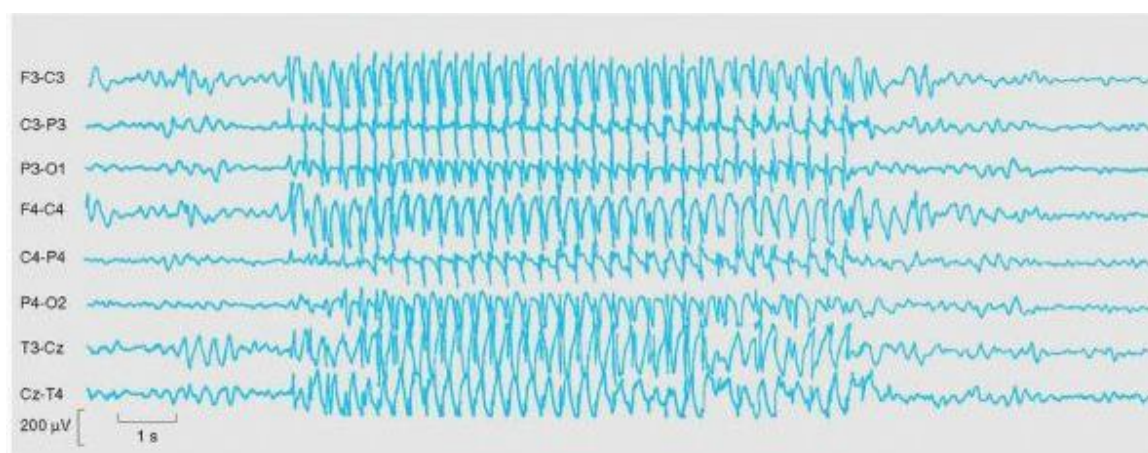
صرعی است که به صورت ارثی منتقل می شود و معمولا از دوران کودکی آغاز شده و به ندرت تا دوران نوجوانی ادامه می یابد. ژن های مرتبط با صرع آبنانس کودکی عبارتند از (۱):

GAGRB2 ، CLCN2 ، CACNA1H

حملات با دوره کوتاه عدم هوشیاری (معمولا به مدت ۵ تا ۱۰ ثانیه) بدون کاهش تنوس وضعیتی مشخص می شوند. تظاهرات حرکتی خفیف مانند بهم خوردن پلک چشم یا چرخش مختصر سر، شایعند. حرکات اتوماتیک پیچیده تر (اتوماتیسم) ناشایع است. پس از قطع تشنج بلافاصله هوشیاری باز می گردد (۱).

¹ Orientation

ممکن است روزانه صدها حمله اتفاق بیفتد که موجب اختلال در کارهای مدرسه و عملکرد اجتماعی می گردد، به نحوی که ممکن است تصور شود کودک از نظر ذهنی عقب افتاده است. مگر اینکه بیماری به درستی تشخیص داده شود. بطور تیپیک می توان با هیپرونتیلیسیون حملات را ایجاد نمود. نوار مغزی امواج بلند نیزه ای و موج ۳ بار در ثانیه را در جریان حملات نشان می دهد (مطابق شکل ۳) (۱).



شکل ۳. نمایی از نوار مغزی بیمار با تشنج آبسانس (صرع کوچک).

در بسیاری از بیمارانی که هوش طبیعی و فعالیت زمینه ای طبیعی در نوار مغزی دارند، حملات آبسانس فقط در دوران کودکی اتفاق می افتد؛ در هر صورت در موارد دیگر، حملات تا زمان بزرگسالی و به صورت تنها یا همراه با سایر انواع تشنج ادامه می یابد (۱).

تشنج های تونیک

با انقباض مداوم عضله مشخص می شوند که می توانند منجر به خشک شدن عضو و عضلات محور بدن در حالت فلکسیون یا اکستنسیون شده و یک علت سقوط ناگهانی است؛ توقف عضلات تنفسی به بروز سیانوز منجر می شود. هوشیاری از دست می رود و در این تشنج فاز کلونیک وجود ندارد (۱).

تشنج های کلونیک

با پرش های کلونیک مکرر همراه با از دست رفتن هوشیاری مشخص می شوند. مرحله تونیک اولیه وجود ندارد (۱).

تشنج های میوکلونیک

با انقباضات ناگهانی، کوتاه و شوک ماندی مشخص می شوند که ممکن است محدود به یک گروه از عضلات یا یک یا چند عضو باشند یا اینکه به صورت ژنرالیزه اتفاق بیفتند. صرع میوکلونیک جوانی شایعترین نوع است که معمولاً در دوران نوجوانی آغاز می شود (۱).

در یک سوم بیماران مبتلا به تشنج های میوکلونیک، سابقه فامیلی تشنج نیز وجود دارد. اختلال از نظر ژنتیکی هتروژن است و در خانواده های مختلف ژن های دخیل عبارتند از (۱):

GAGRA1, CLCN2, CACNB4, BRD2, EFHC1

تشنج های میوکلونیک ممکن است با انواعی از اختلالات نادر نورودژنراتیو ارثی همراه باشند، همچون (۱):

La-forabody neuronal ceroid lipofuscinosis, Unverricht-Lundborg disease

Sialidosis, آنسفالوپاتی میتوکندریال (صرع میوکلونوس با رشته های تکه تکه ی قرمز در بیوپسی عضله).

تشنج های اتونیک

ناشی از کاهش تنوس وضعیتی است و گاهی بدنبال پرش میوکلونیک ظاهر شده و منجر به حمله سقوط می شود. این تشنج ها در بیماری های تکاملی مانند لنوکس-گوستاو^۱ بیشترین میزان شیوع را دارند که در بعضی موارد ناشی از جهش هایی هستند که بر ژن MAPK10 اثر می گذارند (۱).

۲-۲-۲ تشنج های پارسیل (کانونی)

¹ Lennox-Gastaut Syndrome

تشنج کانونی ساده

تشنج کانونی ساده با پدیده ای حرکتی، حسی یا اتونومیک شروع می شود که بستگی به ناحیه مبتلا در قشر مغز دارد. مثلا ممکن است حرکات کلونیک گروهی از عضلات صورت، یک عضو یا حلق اتفاق بیفتد که خودمحدودشونده است؛ همچنین ممکن است این حرکات عودکنند یا به صورت مداوم درآیند؛ و یا اینکه فراگیر شده و به نواحی دیگری از قشر حرکتی توسعه یابند (پیشرفت جکسونی)^۱ (۱).

نشانه های اتونومیک شامل رنگ پریدگی، برافروختگی، تعریق، سیخ شدن موها^۲، اتساع مردمک، استفراغ، قاروقور شکم^۳ و بی اختیاری است. نشانه های روانی شامل دیسفازی، اختلال حافظه (مثل آشنا پنداری)، روند تفکر اجباری، اختلال شناختی، اختلالات عاطفی (مثل ترس، افسردگی، احساس لذت نامناسب)، توهم یا خطاهای حسی است. در جریان یک تشنج پارسیل ساده، هوشیاری باقی می ماند، مگر اینکه دیس شارژ تشنجی به سایر نواحی مغز گسترش یابد و موجب تشنج تونیک-کلونیک (ژنرالیزاسیون ثانویه) شود. اورا بخشی از تشنج است که قبل از کاهش هوشیاری بروز می کند و بیمار تا حدی آن را به خاطر می آورد. گاهی اوقات، اورا تنها یافته یک دیس شارژ صرعی است (۱).

در حالت پس حمله ای (پست ایکتال)، نقص موضعی عصبی مانند همی پارزی (فلج تاد) که در مدت ۰/۵ تا ۳۶ ساعت خود به خود برطرف می شود، یافته ای حاکی از ضایعه موضعی زمینه ای در مغز است (۱).

تشنج های پارسیل مرکب

تشنج های پارسیل مرکب، قبلا با نام تشنج لوب تمپورال یا تشنج پسیکوموتور نامیده می شد که در آن هوشیاری، پاسخ دهی و حافظه دچار اختلال می شوند. معمولا دیس شارژ تشنجی از لوب تمپورال یا قسمت داخلی لوب پیشانی منشا می گیرد اما می تواند از مکان های دیگر نیز آغاز شود. نشانه ها به اشکال مختلف ظاهر می شوند، اما معمولا در هر بیمار به یک قالب منحصر به فرد در می آیند. ممکن است حملات با یک اورا شروع شوند. وجود احساس اپی گاستریک شایع بوده اما اختلالات عاطفی (ترس)، شناختی (آشنا پنداری) و

¹ Jacksonian March

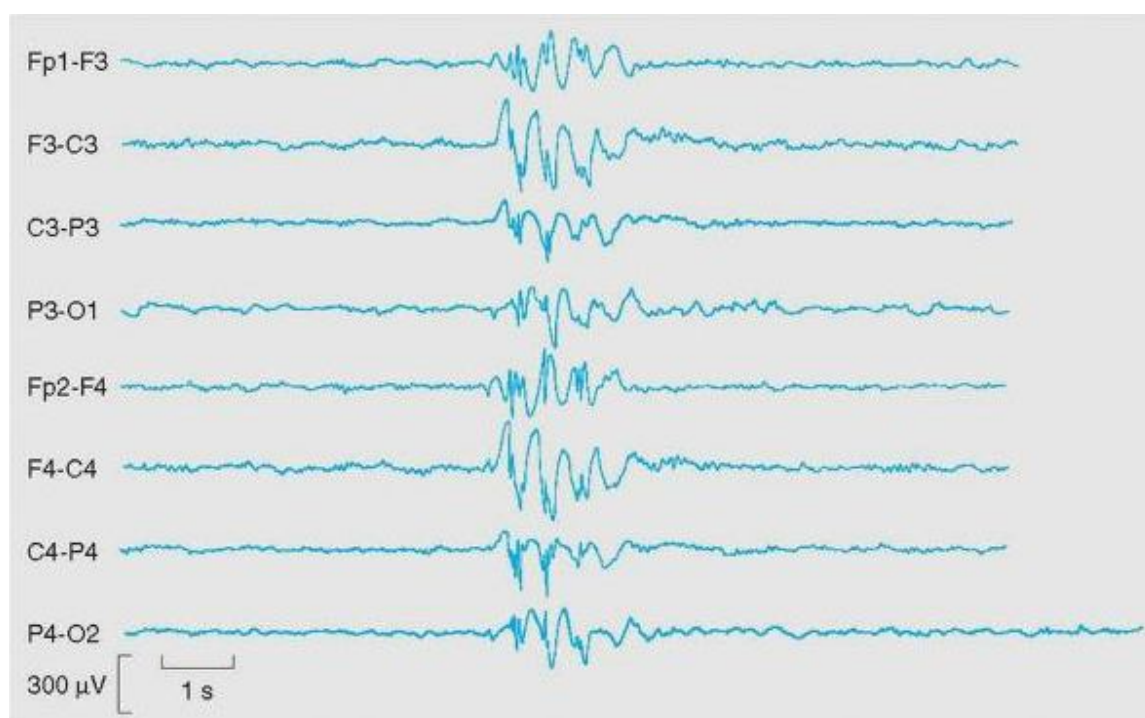
² Piloerection

³ Borborygmus

حسی (توهم بویایی) نیز ممکن است اتفاق بیفتند. سپس هوشیاری دچار اختلال می شود. به طور کلی، تشنج ها به مدت ۱ تا ۳ دقیقه دوام دارند. تظاهرات حرکتی تشنج پارسیل مرکب که با فعالیت حرکتی غیر ارادی و هماهنگ مشخص می شوند، اتوماتیسم^۱ نامیده می شوند که در حدود ۷۵٪ بیماران به صورت حرکات دهانی-زبانی-لب و در ۵۰٪ بیماران به صورت دیگر حرکات گردنی و صورتی و دست تظاهر می کند. نشستن، ایستادن، بازی با اشیاء و حرکات دوطرفه اندام ها شیوع کمتری دارند. ممکن است فراگیر شدن ثانویه اتفاق بیفتد (۱).

۲-۳ تشخیص

تشخیص بالینی تشنج مبتنی بر کشف بالینی یکی از انواع تشنج ذکر شده در متن بالا می باشد. نوار مغزی نیز می تواند کمک کننده باشد (همانند شکل ۴). اما طبیعی بودن آن نمی تواند تشنج را رد کند (۱).



شکل ۴. نمونه ای از نوار مغزی بیمار مبتلا به تشنج.

¹ Automatism

ویژگی های الکتوانسفالوگرافیک که بطور اختصاصی نشان دهنده ی صرع می باشند عبارتند از: امواج نوک تیز بلند^۱ و غیرطبیعی، دیس شارژهایی با چند موج بلند و کمپلکس های نیزه-موج بلند (۱).

ارزیابی تشخیصی استاندارد برای بیماران مبتلا به تشنجی که اخیرا وقوع یافته، در جدول زیر (جدول ۳) آورده شده است (۱):

(شایان به ذکر است که بیماری های توکسیک و متابولیک که می توانند مسبب تشنج باشند، باید در ابتدا رد شوند. زیرا با درمان مشکل زمینه ای، تشنج بیمار کنترل شده و دیگر نیاز به تجویز داروهای ضد تشنج نیست).

ارزیابی تشنج جدید در بیمار سالم	
اخذ شرح حال (از جمله مصرف داروها)	
معاینه ی فیزیکی کامل	
معاینه نورولوژیک کامل	
بررسی های خونی	قند ناشتا
	الکترولیت های سرم
	کلسیم سرم
	بررسی عملکرد کلیوی
	بررسی عملکرد کبدی
	شمارش کامل خون
بررسی از لحاظ ابتلا به سیفیلیس	
اخذ نوار مغزی	
MRI	

جدول ۳. ارزیابی تشخیصی استاندارد در بیماری که اخیرا دچار تشنج شده است.

¹ Spikes

تشنج هایی که منشا موضعی آشکار دارند یا آنهایی که پس از سن ۲۵ سالگی بروز می کنند، نیازمند ارزیابی فوری هستند تا وجود ضایعه ساختمانی مغزی رد شود که برای این منظور می توان از تصویر برداری به روش رزونانس مغناطیسی استفاده کرد (سی تی اسکن کافی نیست). اگر نتوان علتی را یافت، تصمیم برای شروع درمان ضد تشنج طولانی مدت را باید براساس احتمال عود، اخذ نمود. بدنبال یک حمله تونیک-کلونیک ژنرالیزه، می توان در ۳۰ تا ۷۰٪ بیماران بزرگسال درمان نشده، عود تشنج را در مدت ۳-۴ سال در نظر داشت (۱).

۲-۴ درمان

۱-۲-۴ اصول درمان

در صورت وجود علت مشخصی که مسبب تشنج بوده باشد، باید درمان را متوجه آن علت خاص نمود. پاسخ تشنج همراه با بیماری های سیستمیک و متابولیک به داروهای ضد تشنج ضعیف است، اما با اصلاح اختلال زمینه ای این تشنج ها متوقف می شوند. قطع ناگهانی مصرف الکل و سایر داروهای آرام بخش موجب تشنج های خود محدود شونده میشوند که به طور کلی نیازی به درمان با داروهای ضد تشنج ندارند. ترومای حاد سر و سایر ضایعات ساختمانی سر که موجب تشنج می شوند، بایستی به سرعت تشخیص داده و درمان شوند و تشنج ناشی از این ضایعات را باید با درمان دارویی ضد تشنج کنترل نمود. صرع ایدیوپاتیک نیز با داروهای ضد تشنج تحت درمان قرار می گیرد (۱).

چهار اصل کلیدی برای درمان وجود دارد (۱):

(۱) قبل از شروع درمان، بایستی تشخیص صرع را ثابت نمود.

(۲) با توجه به نوع تشنج بایستی داروی مناسب را انتخاب نمود.

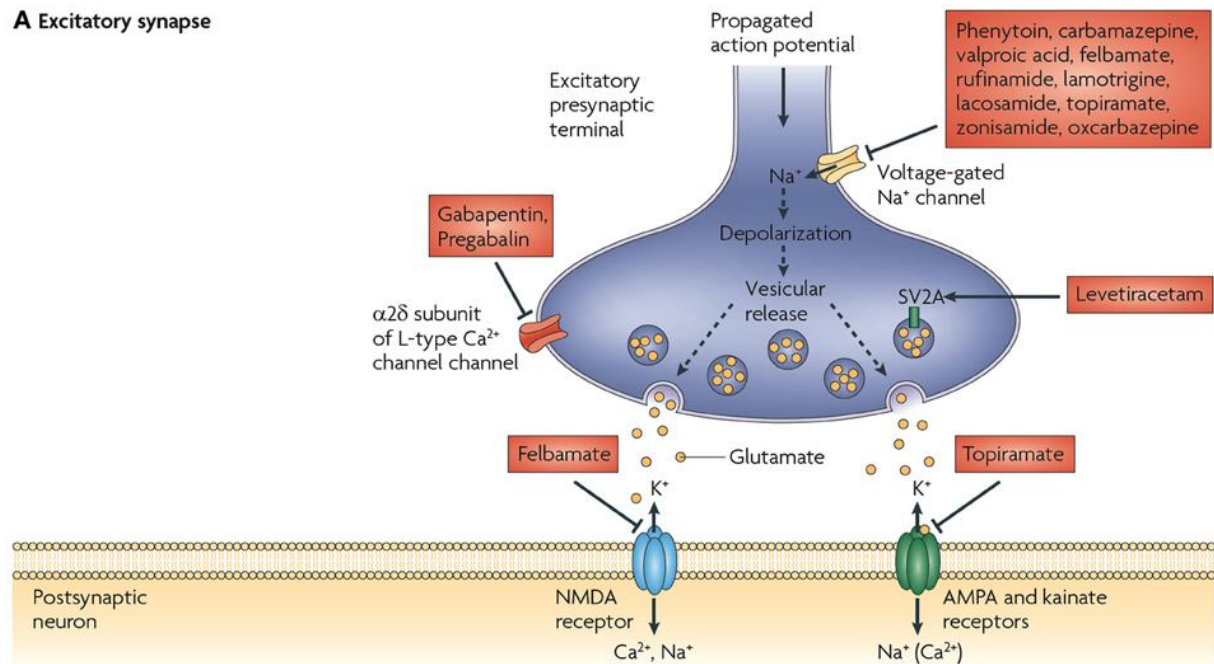
(۳) به جای توجه به سطح سرمی دارو، باید تشنج را کنترل و درمان نمود.

(۴) هر بار بایستی یک دارو را امتحان کرد (درمان چند دارویی از ابتدا صحیح نیست).

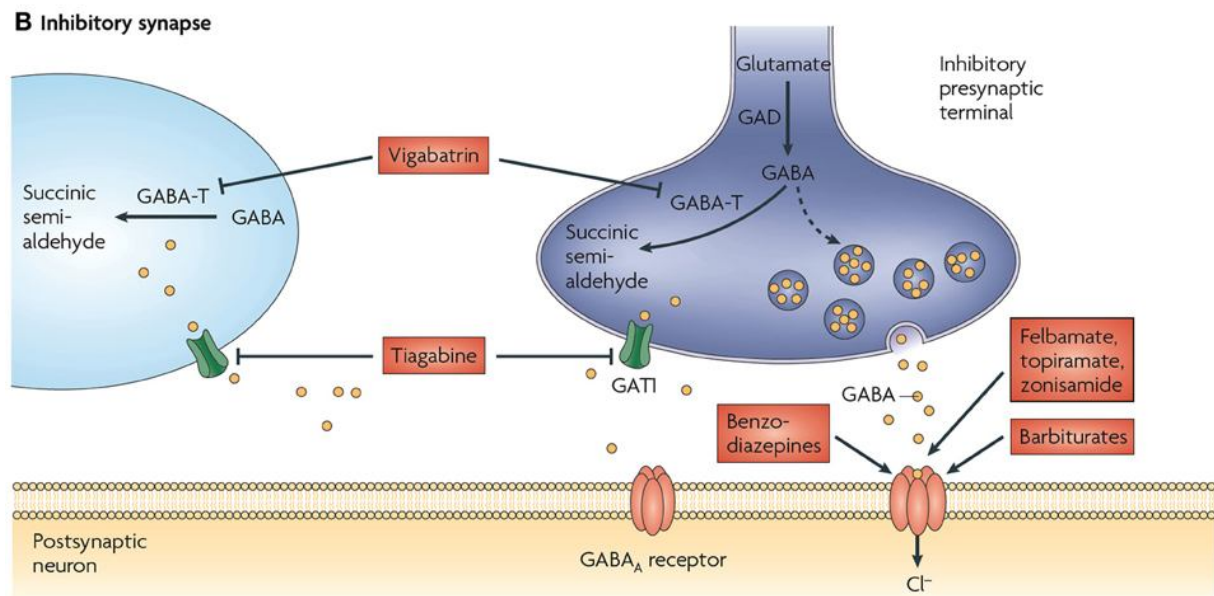
۲-۴-۲ داروهای ضد تشنج

بیشتر داروهای ضد تشنج از طریق دو مسیر از انتقال دهنده های عصبی در مغز اثر می کنند؛ گاباآرژیک و گلوتاماترژیک. شیمای کلی محل و نحوه اثرگذاری داروها در دو مسیر مذکور در شکل زیر آورده شده است (شکل ۵)(۱):

A Excitatory synapse



B Inhibitory synapse



شکل ۵. شمای کلی محل و نحوه اثرگذاری داروها در دو مسیر گاباژریک و گلوتاماترژیک.

۳-۴-۲ استراتژی های درمان

تشنج های مکرر نیاز به درمان دارند. درمان دارویی در بیماری که با تشنج جدید مراجعه می کند به طور کلی به صورت زیر است (جدول ۴)(۱):

تشنج های کانونی (شامل کانونی مرکب) یا تونیک-کلونیک ژنرالیزه ثانویه		فنی توئین کابامازپین لاموتریزین
تشنج های ژنرالیزه	اسید والپروئیک	
	فنوباریتال (با اثر کمتر در تشنج های پارشیل مرکب)	
تشنج های آبسانس	اسید والپروئیک (بدلیل اثرات مرگبار کبدی دی سنین زیر ۱۰ سال و بخصوص زیر ۲ سال ممنوع است)	
	اتوسوکسیماید	
تشنج های میوکلونیک	اسید والپروئیک	
	لوتیراستام	
	زونی سامید	
	کلونازپام	

جدول ۴. لیستی از داروهای مصرفی در بیمار مبتلا به تشنج.

به موازات کسب تجربه در مورد داروهای ضد تشنج جدید، می توان در برخی موارد از آنها به عنوان درمان تک دارویی استفاده کرد. لاموتریزین، لوتیراستام، توپیرامیت و زونیسامید طیف وسیعی از عملکرد را در درمان صرع های پارشیل و ژنرالیزه دارند. اُکسکاربازپین را می توان در درمان صرع پارشیل یا تونیک-کلونیک ژنرالیزه ثانویه

یه صورت تک دارویی به کار برد. گاباپنتین، تیآگابین و پره گابالین را نباید در بیماران مبتلا به صرع ژنرالیزه به کار برد (۱).

نقش مسیرهای سیگنالینگ مختلف در تشنج

صرع یک بیماری پیچیده، مشخص شده توسط وقوع مکرر از انفجار فعالیت های الکتریک (تشنج) در مناطق خاص مغز است. نتیجه رفتاری از حوادث تشنج به شدت بستگی به مناطقی از مغز که تحت تاثیر بیش فعالی هستند قرار دارد (۲)

در اینجا ما از مسیر های سیگنالینگ درون سلولی که در تشنج مناطق صرع خیز دخیل می باشند صحبت خواهیم کرد که شامل: مسیرهایی که توسط مدولاتورهای انتقال دهنده های عصبی فعال شده (دوپامین، نوراپی نفرین و سروتونین) والقای ژن (IEGs) immediate early genes میباشد (۲)

مسیر حاد سیگنالینگ ناشی از تشنجات: نقش نورومدولاتورها:

تشنج به طور سنتی به عنوان یک عدم تعادل مشخص بین انتقال دهنده های تحریکی (گلوتامات) و بازدارنده (گابا) میباشد. نقش مثبت یا منفی مدولاتورها در تنظیم تشنج به گیرنده های درگیر بستگی دارد

دوپامین از طریق دو تایپ مختلف از گیرنده های G پروتئین، به نام D1 و D2 فعالیت می کند فعال شدن گیرنده D1-like (D1 و D5) در کاهش آستانه تشنج و افزایش شدت تشنج نقش دارد (۳)

سروتونین (۵ هیدروکسی، ۵-HT) از طریق یک خانواده از گیرنده هایی عمدتاً G پروتئین برای تعدیل تحریک پذیری عصبی عمل می کند (۴)

فعال شدن گیرنده HT-5 توسط مدیریت آگونیست HT-5 و یا مهارکننده های بازجذب می تواند تشنج کانونی و جنرالیزه را مهار کند ، در حالی که تخریب پایانه های سروتونرژیک و تخلیه مغزاز HT-5 در کاهش آستانه تشنج و افزایش تحریک پذیری عصبی در مدل های تجربی نقش دارد.

اخیرا، افزایش آستانه تشنج ناشی از اسید kainic در موش با افزایش سطح ژنتیکی HT-5 مشاهده شده است

(۵)

پاسخ سلولی حاد به تشنج: فعال شدن ژن (IEGs) : immediate early genes

اولین تظاهراتی که مطرح کرد , بیش فعالی پاتولوژیک می تواند, بیان ژن در مغز را تغییر دهد از مطالعات J. I. Morgan and T. Curran بوده که بیان می کند metrazole ناشی از تشنج - القاء قابل توجهی از بیان mRNA C-fos را در مناطق مختلف از مغز جوندگان سبب می شود

این نویسندگان برای اولین بار مطرح کردند که تا حد زیادی سلول های عصبی جهت فعال سازی سریع از "ژن فوری اولیه" (IEGs؛ معمولا فاکتورهای رونویسی، مانند fos و ژوئن) برای جفت شدن حاد و پاسخ طولانی مدت به محرک های فیزیولوژیکی و همچنین پاتولوژیکی مورد استفاده قرار می گیرند (۶)

القای عوامل رونویسی یک پدیده عمومی در نورون می باشد که پس از تشنج حاد رخ می دهد (۷)

با این حال، C-FOS قطعا فاکتور رونویسی وابسته به فعالیت اولیه و مشخص باقی می ماندو به طور گسترده ای به عنوان یک نشانگر مناسب فعالیت عصبی القا می شود

همانطور که تشنج , القاء رونویسی ژن C-FOS Mrna را در جمعیت های عصبی در زمان های مختلف با استفاده از موش های ترانس ژنیک FOS-lacZ را نشان داد.(8)

این مشاهدات توسط مطالعات متعددی با استفاده از C-FOS mRNA در محل هیپیداسیون یا ایمونوهِستوشیمی C-FOS در مغز موش به عنوان یک راه برای انجام مطالعات نقشه برداری فعالیت پس از تشنج تایید شده است

حال کمی دقیقتر ارتباط بین الگوی القایی C-FOS و پیشرفت تشنج از کانونی به جنرالیزه وجود دارد

فعالیت صرع فوکال القای mRNA ژن C-FOS و پروتئین C-FOS را تنها در برخی مناطق لیمبیک تحریک می کند ، به طور معمول در لایه های سلول گرانول شکنج های دنداندار شروع و سپس در لایه های هرمی CA3 و CA1 پخش می شود. سپس، هنگامی که تشنج های جنرالیزه و موتور لیمبیک و صرع استاتوس رخ می دهد، بیان پروتئین C-fos و mRNA C-fos در سراسر کل قشر مخ و چندین مناطق دیگر مغز شناسایی می شود

(9)

یافته های اخیر نشان می دهد که افزایش سطح ERK فسفریله می تواند یکی از اولین شاخص های ایمونوهیستوشیمی سلول های عصبی در زمان تشنج خود بخودی باشد

در صرع خود به خودی حیوانات ، یک افزایش مشخص ERK در زمان تشنج خود بخودی رخ می دهد و در جمعیت زیادی از سلول های عصبی در فواصل خیلی کوتاه (عنوان ۲ دقیقه) پس از تشخیص تشنج رفتاری آشکار است

آبشارهای سیگنالینگ داخل سلولی در فعال سازی IEGs در هر دو شرایط فیزیولوژیک و پاتولوژیک شده به طور گسترده در نوروپاتولوژی بررسی شدند

دپلاریزاسیون عصبی منجر به افزایش سطح درون سلولی از دومین انتقال دهنده CAMP (به طور معمول، انتقال دهنده عصبی / نورومدولاتور متصل به گیرنده G پروتئین) و Ca^{2+} (به عنوان مثال، کانال های یونی باز مرتبط به گلوتامات متصل به گیرنده های گلوتامات) می شود. هر دو این دواتقال دهنده های دوم کیناز درون سلولی (پروتئین کیناز A و خارج سلولی تنظیم کیناز را ERK) را فعال می کنند که فعالیت همگرا در فسفوریلاسیون عامل رونویسی CREB (cAMP response element binding protein, constitutively present in the nucleus) دارند

به نوبه خود فسفوریلاسیون CREB, رونویسی ژن C-FOS mRNA را فعال میکند و سپس C-FOS mRNA به پروتئین C-FOS ترجمه میشود که به عنوان یک فاکتور رونویسی برای طیف گسترده ای از ژن های مخصوص عصبی عمل می کند (10)

این مکانیزم سریع می باشد، و اجازه می دهد تا سلول های عصبی به سرعت به طیف گسترده ای از پاسخ های طولانی مدت داخل سلولی از جمله القای ژن های درگیر در شکل پذیری سیناپسی و مرگ سلول دپلاریزه گردد

آبشار داخل سلولی فعال شده توسط تشنج تا حد زیادی در کسانی که در شکل پذیری سیناپسی و به ویژه در حافظه بلند مدت درگیرند تداخل دارند (که نیازمند القا IEGs و سنتز پروتئین جدید می باشد). این آبشار به طور گسترده ای در هیپوکامپ مورد مطالعه می باشد که در یادگیری و حافظه نقش دارد، که یکی از صرع خیزترین مناطق مغز می باشد

از این مطالعات، پدیدار می شود که نورون های ناحیه هیپوکامپ در مسیرهای سیگنالینگ برای پاسخ به هر دو محرک فیزیولوژیک و پاتولوژیک مورد استفاده قرار می گیرند. با این حال، این مسیرها تنها زمانی که توسط تشنج فعال میشوند مضر هستند

انواع مختلف الگوی فعالیت ممکن است از واکنش های فیزیولوژیکی یا آسیب شناختی نورونهای هیپوکامپ استخراج شود. به عنوان مثال، تنها محرک صرع (مانند kainic اسید و پیلوکارپین).

انواع دیگر تحریک های الکتریکی، قادر به القا سریع تجمع دندریتیک از ژن mRNA از BDNF و پروتئین در نورون های ناحیه هیپوکامپ مشابه مثال قبل نمی باشند که تصور می شود که در تشنج ناشی از BDNF مشارکت دارد

گیرنده‌های گلوتامات

در طول سال‌های اخیر، دانش ما در مورد عملکرد سیستم گلوتامات و اهمیت آن برای فیزیولوژی سیستم عصبی بطور چشمگیری افزایش یافته است.

درک ما از نقش فیزیولوژیکی سیستم گلوتامات بسیار عمیق است و ما می‌توانیم بسیاری از داده‌ها در مورد دخالت سیستم گلوتامات در تنظیم بسیار پیچیده فرآیندهایی مانند نوروپلاستیسته، مرگ سلولی، بقای سلول، و بسیاری دیگر ارائه دهیم

علاوه بر این، این اکتشافات ممکن است اهمیت عملی داشته باشد چرا که ما ممکن است این مسیرها با توسعه بسیاری از اختلالات ناتوان کننده مانند بیماری آلزایمر، بیماری هانتینگتون، آسیب ایسکمیک، صرع، اسکیزوفرنی یا افسردگی مرتبط باشد

با وجود پیشرفت غیر قابل انکار در درک ما از نقش محوری سیستم گلوتامات در عملکرد مغز، برخی از مسائل که نیاز به روشن شدن دارد هنوز هم وجود دارد.

ژن‌های ساب یونیت‌های گیرنده‌های ایونوتروپیک گلوتامات (NR2A، NR2B):

گیرنده کانال N-متیل-D-آسپارتات (NMDA) که بسیار نفوذپذیر به یون‌های کلسیم می‌باشد به عنوان یک سوئیچ برای شکل‌گیری حافظه توسط gating پلاستیسته سیناپسی می‌باشد (۱۲)

NMDA از هتروالیگومرهای NR1، NR2، و گاهی، زیر واحد NR3 تشکیل شده است (۱۳)

در هیپوکامپ موش بالغ، NR2A و NR2B زیرواحدهای NR2 غالب هستند، و الگوی ترکیبی و تنظیم دینامیکی بسیاری از خواص بیوفیزیکی و دارویی گیرنده‌های NMDA می‌باشند (۱۴)

در سیناپس‌های مغز، فعال شدن گیرنده‌های پس سیناپسی NMDA باعث حوادث پیچیده، از جمله cAMP-response element binding protein (CREB) و رونویسی وابسته می‌گردد، که در سیستم‌های حافظه موجودات اعم از Aplysia در پستانداران نقش دارد (۱۵)

نکته مهم، قبل از اعمال نقش فیزیولوژیکی، گیرنده های NMDA تازه سنتز شده باید به دندریت ها حمل و نقل و محدود به سیناپس شوند. بنابراین، تجمع داخل سلولی و هدف قرار دادن سیناپسی گیرنده های NMDA باید یکی از پیش نیازهای لازم برای فعالیت گیرنده NMDA باشد

با این حال، اطلاعات کمی در مورد نقش دقیق و مکانیزم حمل و نقل گیرنده های NMDA در داخل بدن شناخته شده است

فصل دوم

مرور و بررسی متون

طیف وسیعی از تغییرات ژنی در جریان وقوع تشنج در بیماران ایجاد می گردد و دانستن مکانیسم های مولکولی زمینه ای، سرآغازی برای شروع درمان می باشد. از مطالعه بر روی مدل های حیوانی بر می آید که تغییر در بیان تعدادی از ژن ها (به صورت کاهش یا افزایش بیان ژنی) مشهود است که مطالعات بر روی این مدل ها می تواند به عنوان ابزار درمانی در درمان بیماری صرع مورد توجه قرار می گیرد. از سوی دیگر یافتن داروهای موثر بر روی هر یک از مسیرهای پیام رسانی داخل سلولی و بیان ژنی موثر در ایجاد تشنج، می تواند به عنوان یک درمان دارویی جدید در کنترل تشنج موثر باشد (16).

این احتمال وجود دارد که گیرنده های کاینیک اسید در ایجاد عدم تعادل میان فعالیت تحرکی و مهار مرتبط با تشنج نقش داشته باشد. تزریق کاینیک اسید به عنوان یک مدل حیوانی جهت ایجاد صرع لوب تمپورال انسانی (TLE) مورد استفاده قرار می گیرد. مهار آزاد شدن گابا و فعال شدن گیرنده های پس سیناپسی کاینیک اسید می تواند برای اثر تشنج زایی حاد کاینیک اسید در نظر گرفته شود، هر چند که این وقایع نمی تواند صرع مزمن ایجاد شده ماه ها پس از تجویز کاینیک اسید را توضیح دهد. تشنج یک تعدادی از تغییرات مولکولی و ساختاری را همراه با کاهش آستانه تحریک پذیری نظیر هیپوکامپ آغاز می کند. تشکیل سیناپس های غیر طبیعی مربوط به گیرنده های کاینیک اسید در ایجاد TLE دخیل دانسته اند (17).

گلوتامیک اسید یکی از مهمترین ناقلین تحرکی در سیستم اعصاب مرکزی است که از لحاظ گیرنده هایش به دو گروه متابوتروپیک و آیونوتروپیک تقسیم می گردد. گیرنده های آیونوتروپیک بر اساس تمایل اتصال آگونیست اختصاصی شان شامل α -amino acid-3-hydroxy-, N-methyl-D-aspartate (NMDA)، 5-methyl-4-isoxazole (AMPA) و kainic acid (KA) می باشد (18).

در مدل تشنجات ناشی کیندلینگ و پیلوکارپین، فعال شدن ساب یونیت گیرنده های NR2A برای ایجاد تشنجات لیمبیک ضروری می باشد و این در حالی است که تمامی ساب یونیت های گیرنده NMDA که در مرگ سلول نوروپاتی ناشی از تشنج ممکن است نقش داشته باشند (19).

در مورد ساب یونیت NR2B مشاهده شده است که بیشتر از سایر ساب یونیت های NMDA در وقایع پاتولوژیکی مربوط به تحریک پذیری بیش از مسیرهای گلوتاماترژیک نقش دارد (20).

کوئرسستین یک فلاونوئید ۳،۳'،۴،۵-پنتاهیدروکسی فلاون است (21) که در میوه ها و سبزیجات گوناگونی یافت می شود (22). میزان جذب روزانه فلاونوئید ها در حدود ۱۰۰۰-۲۰ میلی گرم می باشد. کوئرسستین که به منزله بخش مهمی از فلاونوئید های جذبی است (بخصوص در پیاز، سیب و چای)، نیمه عمر پلاسمایی طولانی (۱۱-۲۸ ساعت) دارد و در صورتی که دوز آن تکرار شود، می تواند در پلازما تجمع یابد (23). برای دستیابی به نتایج خوب، دوز بالایی از کوئرسستین مورد نیاز است. از آنجا که کوئرسستین متحمل متابولیسم اولین عبور می گردد (24)، توانایی نفوذ به سد خونی-مغزی را دارد و در برخی از مطالعات میزان عبور آن را بیش از ۶۵/۵۴ درصد تخمین زده اند (25). به نظر می رسد که متابولیت های کوئرسستین و گلیکوزید ها نسبت به آگلیکون از اثرات محافظتی اعصاب و قدرت نفوذ به سد خونی-مغزی برخوردارند (26)

بنابراین، با توجه به مطالعات گذشته این مطالعه طراحی گردید تا تاثیر این دارو بر روی بیان ژنی ساب یونیت های گیرنده های سیستم گلوتاماترژیک در جریان تشنج بررسی گردد و مشخص شود که آیا کوئرسستین از طریق مهار بیان ژنی ساب یونیت های گیرنده گلوتاماترژیک هم اثر ضد تشنجی خود را ایجاد می کند؟ در انتخاب ژن مربوط به ساب یونیت ها با توجه به اهمیت ساب یونیت های NR2A، NR2B تحت تاثیر داروی کوئرسستین، در مدل تشنجی کاینیک اسید مورد بررسی قرار می گیرد.

نتایج موجود از بررسی بافت تشنجی در انسان حاکی از افزایش بیان گیرنده های کاینیک اسید از نوع GluK1 در هیپوکامپ بیماران مبتلا به TLE مقاوم به درمان دارویی است که به نظر می رسد یک نوآرایی در جریان های نورونی که گیرنده های کاینیک اسید را در بر می گیرد در افرادی که از بیماری صرع رنج می برند، وجود دارد (27). گیرنده های NMDA شامل گیرنده های NR1 (NMDAR1)، NR2 (NMDAR2) و NR2B (NMDAR2) (NR2) می باشد. گیرنده NR2 دارای ساب یونیت های D-A (NR2A، NR2B، NR2C، NR2D) می باشد. NR3 دارای ساب یونیت های B-A (NR3A، NR3B) (28). گیرنده های AMPA شامل ساب یونیت های GluR1، GluR2، GluR3، GluR4 می باشد (28).

افزایش نسبت GluA1/GluA2 و GluN2B/GluN2A در مبتلا به بیماران صرع پایدار الکتریکی در خواب و در صرع مقاوم مشاهده شده است (29).

کاربرد نتایج حاصل از مطالعات مربوط به مدل های حیوانی به مغز انسان:

در مورد ترکیب ساب یونیت های گیرنده های نابالغ و بسیار تحریک پذیر NMDA ، یک کاهش در ساب یونیت N2B در مدل جوندگان گزارش شده است در حالی که در انسان میزان این ساب یونیت افزایش یافته است. نسبت گیرنده های غیر N2A به N2A در هر دو مدل انسانی و حیوانی احتمالاً افزایش یافته باقی می ماند (30).

کوئرسستین دارای اثرات فارماکولوژیکی متعددی است از جمله اثرات آنتی اکسیدانی، ضد التهابی، محافظتی کبد و ضد سرطانی می باشد (21 و 31,36). کوئرسستین اثرات بیولوژیکی متفاوت دیگری نیز دارد که از جمله آنها می توان به موارد زیر اشاره کرد: کاهش ضایعات ایسکمیک مغزی در مدل های ایسکمی ناحیه ای دائمی (37). القای مرگ سلولی (آپوپتوز) در سلول های سرطانی (38,39). کاهش ریسک بیماری های مزمن مرتبط با استرس اکسیداتیو همچون دیابت، سکته و بیماری های قلبی (40,41)

استفاده مزمن کوئرسستین خوراکی (۵۰-۲۵ میلی گرم/کیلوگرم) بدنبال قطع مصرف اتانول، اثرات محافظتی در برابر صرع های ناشی از پتیلن تترازول نشان داده است (42). با این حال مشخص شده که کوئرسستین نمی تواند در برابر تشنج ها و بیماری های حرکت ناشی از N-methyl D-aspartate (NMDA) رت ها، محافظت ایجاد کند و علاوه بر این مشخص شده که اثرات محافظتی و سمی کوئرسستین به زمان و دوز آن وابسته است (43). بطوری که فلاونوئید ها و من جمله ی آنها کوئرسستین، در غلظت پایین سبب تحریک پرولیفراسیون و افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی کل می شوند اما در غلظت بالا سبب کاهش توانایی زیستی، کاهش محتویات تیول، کاهش ظرفیت آنتی اکسیدانی کل، کاهش فعالیت سوپراکسید دسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون اس-ترانسفراز می شوند (44).

در مطالعات آزمایشگاهی صورت گرفته مشخص شده که کوئرسستین اثرات مفیدی بر مدل های مختلف بیماری های مغزی بصورت درون تنی دارد (به خصوص مشکلات مغزی-عروقی) که برخی این اثرات مفید را به دلیل احتمال نفوذ بالای کوئرسستین به سد خونی-مغزی و افزایش اثر آن بر مغز می دانند (26).

در مطالعه ی دیگری که به بررسی اثرات عصبی محافظتی و نیز مضرات کوئرتستین در مدل های بیماری پارکینسون پرداخته، مشخص شده است که کوئرتستین دارای اثرات محافظتی زود هنگام و اثرات سمی دیر هنگام می باشد. ضمناً بازه ای باریک از دوز درمانی کوئرتستین مشخص شده به گونه ای که در این مطالعه بیان شده است که کوئرتستین در دوزی معادل ۲ برابر دوزی که در آن حداکثر اثر محافظتی خود را دارد، اثرات سمی خود را آشکار می سازد (۳۴).

از سوی دیگر اثرات ضد تشنجی کوئرتستین در مدل های حاد و مزمن تشنج ناشی از پنتیلن تترازول مورد مطالعه قرار گرفته است. کوئرتستین در مدل حاد تشنج نتوانست تشنج را در رت ها کنترل کند. البته در صورتی چند دوز از دارو قبل تجویز پنتیلن تترازول تجویز شده بود توانست زمان مرگ رت ها را به صوت معنی داری به تاخیر بیندازد (44). در مدل مزمن کیندلینگ در محدوده باریکی از دوز در کنترل تشنج اثراتی داشته است. دوز ۱۰۰ کوئرتستین بهترین اثر را نشان داده است (45).

۲ اهداف و فرضیات (OBJECTIVE & HYPOTHESIS):

الف-هدف اصلی طرح (General Objective):

تعیین اثرات کوئرستین بر بیان ژن های ساب یونیت های گیرنده های ایونوتروپیک گلوتامات (NR2B, NR2A) و در تشنج ناشی از کاینیک اسید در موش

ب-اهداف فرعی (Specific Objectives):

- تعیین اثرات پیش درمانی با کوئرستین 50 mg/kg به مدت یک هفته بر بیان ژن ساب یونیت های NR2A و NR2B گلوتامات و، ۰ و ۷ روز پس از تزریق کاینیک اسید در هیپوکامپ

- تعیین اثرات پیش درمانی با کوئرستین 100 mg/kg به مدت یک هفته بر بیان ژن ساب یونیت های NR2A و NR2B گلوتامات و، ۰ و ۷ روز پس از تزریق کاینیک اسید در هیپوکامپ

- تعیین بیان ژن های ساب یونیت های NR2A و NR2B گلوتامات و ۰ و ۷ روز پس از تزریق کاینیک اسید در هیپوکامپ موش هایی که فقط سالین دریافت می کنند

- تعیین بیان ژن های ساب یونیت های NR2A و NR2B گلوتامات و ۰ و ۷ روز پس از تزریق سالین در هیپوکامپ موش های کنترل (فقط سالین دریافت می کنند)

ج-اهداف کاربردی (Applied Objectives):

مطالعه مولکولی بر روی مکانیسم های ایجاد تشنج ما را در یافتن تارگت های دقیق برای طراحی داروهایی با اثرات ضد تشنجی موثر بر آنها یاری می نماید

د-فرضیه ها (Hypothesis) یا سؤال های پژوهش:

- پیش درمانی با کوئرستین 50mg/kg به مدت یک هفته قبل از تزریق کاینیک اسید سبب تغییر بیان ژن ساب یونیت های NR2A و NR2B گلوتامات و در روزهای ۰ و ۷ پس از ایجاد تشنج می گردد.

- پیش درمانی با کوئرستین 100mg/kg به مدت یک هفته قبل از تزریق کاینیک اسید سبب تغییر بیان ژن ساب یونیت های NR2A و NR2B گلوتامات در روزهای ۰ و ۷ پس از ایجاد تشنج می گردد

فصل سوم

مواد و روش کار

حیوانات

در مجموع موش BALB / c 28 نر از موسسه رازی (کرج) به دست آمده و مستقر در دو گروه در هر قفس در شرایط آزمایشگاهی استاندارد شدند. آنها در دمای ثابت اتاق ($21 \pm 2^{\circ}\text{C}$) تحت یک سیکل تاریکی ۱۲ ساعت نور با دسترسی آزاد به آب و غذا نگه داشته شد.

همه آزمایش های حیوانی با توجه به مصوبه شورای اتحادیه اروپا ۲۴ نوامبر ۱۹۸۶ (EEC / ۶۰۹/۸۶) با توجه به حداقل رساندن تعداد حیوانات و درد و رنج آنها انجام شد.

داروها

کوئرستین و کاینیک اسید از Sigma (St Louis, MO, USA) خریداری شد. سایر داروهای مورد استفاده در این پژوهش شامل زایلازین (Loughrea، شرکت Galway، ایرلند) و کتامین (Rotexmedica، GmbH، آلمان) بودند.

بررسی اثر کوئرستین در گروه های مطالعه به صورت زیر بود:

- تجویز سالین (10 ml/kg) به مدت یک هفته کشتن حیوانات در روزهای ۰ و ۷ (۲ گروه) صورت گرفته است.

- تجویز کوئرستین (50 mg/kg) به مدت یک هفته و سپس تزریق کاینیک اسید (10 mg/kg) و و کشتن حیوانات در روزهای ۰ و ۷ (۲ گروه) صورت گرفت.

- تجویز کوئرستین (100 mg/kg) به مدت یک هفته و سپس تزریق کاینیک اسید (10 mg/kg) و کشتن حیوانات در روزهای ۰ و ۷ (۲ گروه) صورت گرفت

سپس به منظور بررسی بیان ژن ساب یونیت های ایونوتروپیک گلوتامات (NR2B,NR2A) از روش RT-PCR کمی استفاده شد

مطالعه مولکولی

به منظور بررسی بیان در سطح RNA:

پس از انجام نمونه گیری نمونه های بافت فریز شده، سپس از نمونه های مربوطه RNA استخراج گردید.

سپس از روی RNA، با استفاده از توالی اولیگو dT، cDNA ساخته شد.

از روش Real time PCR به منظور بررسی میزان بیان ژنهای مورد مطالعه استفاده گردید.

روش بررسی بیان ژنها با استفاده از تکنیک Real time PCR:

در ابتدا پرایمرها مربوط به ژنهای مورد بررسی با استفاده از توالی cDNA اگزون این ژنها طراحی گردید.

با استفاده از کیت های استخراج RNA و سنتز cDNA، RNA از بافتهای فریز شده در نیتروژن مایع استخراج شده و cDNA سنتز گردید

NR2A F: GGGATGACCAACGCTTAGTT 104 bp

R: CCTCAAGGATGACCGAAGAT

NR2B F: CCCACAGGGAAATCTGTCTT

R: AAGGAGGGCATTCTTTGCTA 115 bp

انجام تکنیک Real time PCR:

در این تحقیق به منظور بررسی بیان ژن ساب یونیت های ایونوتروپیک گلوتامات (NR2B,NR2A) از روش کمی Real time PCR استفاده شد. بدین منظور نمونه های بدست آمده فریز شده و به آزمایشگاه مرجع انتقال یافت. از نمونه های مربوطه با استفاده از کیت های استخراج، RNA بدست آمد و با استفاده از کیت سنتز

cDNA، cDNA مورد نیاز ساخته شد. در این مرحله با استفاده از کیت Real time PCR در پلیت های ۹۶ تایی برای هر نمونه تست گذاشته شد (به منظور بررسی میزان بیان 2 ژن هدف).

استخراج RNA :

خالص سازی RNA سالم، قدم اولیه بسیاری از تکنیک های زیست شناسی مولکولی، از جمله نورتن بلات واکنش زنجیره ای پلیمرز کمی (qPCR) و روش های microarray است. استخراج RNA به طور معمول با استفاده از روش فاز جامد و یا فنل کلروفرم انجام می شود. مشکل اصلی استخراج RNA، ماهیت در همه جا حاضر RNases است، آنزیم هایی که به سرعت RNA هارا تجزیه می کنند. بسیاری از RNase ها دارای پیوند داخل زنجیره ای دی سولفیدی می باشند که باعث می گردد آنها به خصوص به دنا تورا سیون مقاوم باشند. جوشاندن و عوامل دنا تورا سیون کننده بر روی فعالیت RNase بی اثر هستند زیرا RNase می تواند به سرعت refold شود و علاوه بر این، بر خلاف DNases، RNases ها برای فعالیت به کاتیونهای دو ظرفیتی نیازی ندارد. RNase همچنین بر روی پوست حضور دارد، که یکی دیگر از منبع آلودگی بالقوه در سراسر محیط آزمایشگاه است. از بین بردن RNases ممکن است دشوار باشد، هر چند که با مراقبت و مقابله مناسب، استخراج RNA با کیفیت بالا از نمونه های بیولوژیکی مهم قابل دسترسی است. از این رو رعایت برخی از نکات هنگام کار بر روی نمونه های الزامی است (۴۶)

- استخراج RNA در زیر هود آزمایشگاهی
- استریلیزاسیون ابزار مورد استفاده در حرارت بالا
- استفاده از دستکش و تعویض مرتب آن
- استفاده از ماسک دهانی به علت وجود RNase در ذرات آئروسل بزاق
- استفاده از آب^۱ DEPC که باعث غیر فعال سازی نوکلئاز ها و تغییر کووالان ریشه های هیستیدین در RNase ها می شود.

خالص سازی RNA با استفاده از تکنولوژی RNeasy :

روش RNeasy بیان کننده یک تکنولوژی مورد تایید برای خالص سازی RNA است این تکنولوژی ترکیبی از خواص اتصال انتخابی از یک غشاء بر اساس سیلیکا با سرعت بالا از تکنولوژی microspin است. یک سیستم بافری اختصاصی با نمک بالا اجازه می دهد تا ۱۰۰ میکروگرم RNA که بیش از

^۱ . Diethylpyrocarbonate

۲۰۰bp طول دارد به غشاء سیلیکا RNeasy متصل شود. نمونه های بیولوژیکی ابتدا لیز و هموژن شده در حضور بافر حاوی دناچوره کننده گوانیدین تیوسیانات، که بلافاصله RNases را برای اطمینان از خالص سازی RNA سالم غیر فعال می کند. اتانول اضافه شده شرایط اتصال مناسبی را ایجاد می کند و سپس نمونه به ستون RNeasy، که در آن کل RNA ها به غشاء متصل شده و آلاینده ها بطور موثری شسته می شوند. سپس RNA های با کیفیت بالا در ۳۰-۱۰۰ میکرولیتر آب شستشو می شود (46).

(در این تحقیق نیز از RNeasy Mini Kit (Qiagene, USA) استفاده شد.

مواد و وسایل مورد نیاز :

(۱) β مرکاپتواتانول

(۲) اتانول ۷۰٪

(۳) میکروسانتریفوژ

(۴) سمپلر متغیر (از ۱۰ تا ۱۰۰۰ میکرولیتر) (Eppendorf, Germany)

(۵) نوک سمپلر زرد و آبی

(۶) میکروتیوپ ۱/۵ میلی لیتری

(۷) هموژنایزر (Ultrasonic Processor UP100H)

۱- اندازه بافت نباید از ۳۰mg بیشتر باشد. بافت ۱ در مقدار مناسبی از بافر RLT توسط هموژنایز هموژن گردید. مطابق جدول (۱-۳) : مقدار بیش از ۲۰mg را در ۳۵۰ μ l از بافر RTL و مقدار ۳۰mg > در ۶۰۰ μ l از بافر RLT حل شد لایزت ۱ با حداکثر سرعت به مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ شد. با دقت مایع رویی به وسیله پی پت خارج شده، و از آن در مرحله ۲ استفاده شد.

۲- یک حجم از اتانول ۷۰٪ به لایزت اضافه شده و به خوبی با پی پت مخلوط گردید، سپس به سرعت کار وارد مرحله ۳ گردید.

۳- مقدار تا کمتر از 700λ از نمونه که شامل هر نوع رسوب به یک RNeasy Mini spin column که در یک لوله ۲ml collection قرار داده شده منتقل شده و سپس درب لوله بسته شده و با دور $8000g$ به مدت ۱۵ سانتریفوژ گردید و هر نوع مایع عبوری را که در لوله جمع شده بود دور ریخته شد.

برای هضم DNA، مطابق مراحل ۱ تا ۴ از On-column DNase از Mini Kit Part 2 استفاده گردید. نکاتی که قبل از شروع کار با کیت RNase-Free DNase باید توجه کرد:

اگر برای اولین بار از کیت RNase-Free DNase استفاده می شود، استوک DNase I را با تزریق 550 میکرولیتر آب بدون RNase با استفاده از سوزن و سرنگ RNase-Free را باید به ویال DNase I اضافه کرده و به آرامی ویال را سروته کرده تا مخلوط شود و به هیچ عنوان ورتکس نشود.

برای ذخیره سازی طولانی مدت محلول استوک DNase I، آن را به قسمت های مساوی تقسیم کرده و در دمای منفی 20 درجه برای ۹ ماه می توان ذخیره کرد همچنین می توان ویال ها را در $2-8$ درجه سانتیگراد تا ۶ هفته ذخیره کرد. پس از ذوب کردن ویال برای استفاده به هیچ عنوان آن را نباید مجدداً فریز کرد.

۱- 350 میکرولیتر بافر RW1 را به ستون RNeasy اضافه کرده، درب ستون را بسته برای ۱۵ ثانیه در دور $8000g$ ($\geq 10,000$ rpm) سانتریفوژ کرده سپس جریان عبوری دور ریخته شد.

۲- 10 میکرولیتر از محلول استوک DNase I (به بالا رجوع کنید) به 70 میکرولیتر بافر RDD اضافه شد و به آرامی با سروته کردن لوله مخلوط گردید و به طور مختصر سانتریفوژ شد.

۳- ترکیب انکوباسیون DNase I (80 میکرولیتر) به طور مستقیم به غشاء ستون RNeasy اضافه شد، و در دمای $20-30$ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه در روی میز آزمایشگاه قرار گرفت.

۴- 350 میکرولیتر بافر RW1 به ستون RNeasy اضافه شده، درب ستون را بسته، برای ۱۵ ثانیه در بیشتر از $8000 \times g$ سانتریفوژ شد. قسمت عبوری دور ریخته شد.

۵- مقدار 500λ از بافر RPE به ستون RNeasy Mini spin اضافه شد و سپس درب لوله بسته شده و به مدت ۱۵ ثانیه در $8000g$ سانتریفوژ شد و قسمت عبوری دور ریخته شد.

۶- مقدار 500λ از بافر RPE به ستون RNeasy Mini spin اضافه شد درب لوله بسته شده و به مدت ۲ دقیقه در $8000g$ سانتریفوژ گردید.

۷- ستون RNeasy Mini spin در یک لوله $1.5ml$ جدید قرار داده شده و مقدار 30 تا 50λ از آب RNase-free به membrane ستون به طور مستقیم اضافه شد و سپس درب لوله بسته شده و در دور $8000g$ به مدت ۱min سانتریفوژ شد تا RNA را شستشو دهد.

۸- به منظور اینکه محصول RNA بیشتر از ۳۰ mgμ شود مرحله ۷ تکرار گردید.

جدول (۳-۱). حجم بافر RLT برای نمونه اختلال و همگن

Sample	Amount	Dish	Buffer RLT	Disruption and homogenization
Animal cells	$<5 \times 10^6$	<6 cm	350 μ l	Add Buffer RLT, vortex ($\leq 1 \times 10^5$ cells);
	$\leq 1 \times 10^7$	6-10 cm	600 μ l	or use QIAshredder, TissueRuptor®, or needle and syringe
Animal tissues	<20 mg	–	350 μ l*	TissueLyser LT; TissueLyser II; TissueRuptor, or mortar and pestle followed by QIAshredder
	≤ 30 mg	–	600 μ l	or needle and syringe

برای سنجش کیفیت RNA خالص شده که با تکنولوژی RNeasy Mini Kit QIAGEN (cat. nos. 74104) بدست آمده و برای اطمینان از کیفیت RNA های بدست آمده از الکتروفورز با ژل آگاروز ۱٪ و رنگ DNA stain به همراه RNA Ladder استفاده گردید.

سنتز cDNA :

برای سنتز cDNA از کیت (BIONERR) AccuPowerR CycleScript RT PreMix (dn6) استفاده شد. این کیت رونویسی معکوس آماده برای استفاده است، که می تواند سنتز cDNA همگن را از طریق چرخه های دمایی تولید کند. این محصول شامل تمام اجزاء از جمله ترانس کریپتاز معکوس مقاوم به حرارت CycleScript ، dNTPs، reaction buffer، primer و تثبیت کننده های آنزیم رونویسی معکوس است و این کیت به مدت ۲ سال در ۲۰- درجه سانتیگراد پایدار است. AccuPower® Cycle Script RT

PreMix (dN6) فعالیت رونویسی معکوس بالایی در محدوده گسترده ای از دمای های معمولی بین ۴۲ درجه سانتی گراد و ۵۵ درجه سانتی گراد دارد. این واکنش در از ۲ یا ۳ مرحله تشکیل می شود.

مرحله اول : در این مرحله که در دمای ۱۵ ~ ۲۵ درجه سانتیگراد انجام می شود، پرایمر های کوتاه بطور کامل به رشته الگو متصل می شوند (annealing).

مرحله دوم : این مرحله که بصورت اختیاری است در دمای ۴۲~۴۸ درجه سانتیگراد برای سنتز cDNA انجام می شود.

مرحله سوم : این مرحله که در دمای بالای ۵۰ ~ ۵۵ درجه سانتیگراد انجام می شود، که در آن ساختار دوم RNA الگو مانع رونویسی معکوس می شود ذوب شده و رونویسی معکوس نیز رخ می دهد.

استفاده از این کیت دارای مزیت های زیادی است، از جمله کاهش قابل توجه در زمان راه اندازی واکنش، بدون نیاز به اضافه کردن پرایمر و مرحله دناتوراسیون RNA الگو.

هریک از لوله های CycleScript® AccuPower شامل تثبیت کننده (حق ثبت اختراع در ایالات متحده و کره) است، که می تواند ترانس کریپتاز معکوس CycleScript را تا ۲ سال در -۲۰ درجه سانتی گراد حفظ کند. برای استفاده از این کیت کافی است تا RNA الگو و آب DEPC را به میکروتیوب های لیوفیلیزه اضافه کرد. در این تحقیق مقدار ۴ میکرولیتر از RNA استخراج شده به ویال لیوفیلیزه اضافه گردید (توصیه شده غلظت RNA توتال الگو در حدود ۰.۱ تا ۱ میکروگرم باشد). حجم واکنش ۲۰ میکرولیتر است بنابراین با اضافه کردن ۱۶ میکرولیتر از آب DEPC حجم واکنش به ۲۰λ رسانده شد. پلت شفاف ته ویال لیوفیلیزه با ورتکس یا ضربه زدن، و اسپین مختصر بطور کامل حل شد. پلت باید به طور کامل حل شود. سنتز cDNA با واکنش چرخه ای طبق مراحل زیر با استفاده از دستگاه ترموسایکلر ۹۶ خانه Veriti 96 Well, Applied Biosystems باتوجه به دمای ذکر شده در کیت انجام گرفت :

CT RT 1		
Step 1	15~25°C 30 sec: primer annealing	Repeat 12 times or less
Step 2	42~45°C 4 min: cDNA synthesis	
Step 3	55°C 30 sec: melting secondary structure & cDNA synthesis	
Heat inactivation	95°C 5min	

برای نگهداری طولانی مدت cDNA سنتز شده، ویال ها ۱ در فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد قرار داده شد.

روش Real-time PCR :

Real-time RT-PCR پیشرفتی است که نسبت به سایر روش های مرسوم تعیین مقدار دارای چند مزیت اضافی است. مزیت اصلی **real-time RT-PCR** این است که با ردیابی میزان تکثیر محصول در هر دور، مقداری الگوی اولیه را به طور دقیق و قابل تکرار تعیین می کند، در حالی که در روش مرسوم، محصول واکنش در انتها اندازه گیری می شود. به علاوه **real-time RT-PCR** روش سریعی است که ممکن است چند نوع ژن را به طور همزمان آنالیز کند و دیگر نیازی به روش های تعیین مقدار پس از **PCR** نیست. به علت حذف مراحل آنالیز پس از **PCR**، وقوع آلودگی کاهش می یابد و بازده بالاتری حاصل می شود. اگر چه **real-time RT-PCR** مزایای بسیاری نسبت به روش های مرسوم دارد، معایبی نیز دارد: هزینه بالاتر و ناتوانی در تشخیص اندازه محصول می تواند بین تکثیر **cDNA** و **DNA** را مشکل نماید (47).

real-time RT-PCR در پلیت های ۹۶ خانه انجام می شود و سیگنال فلوروسنت (تجمع آمپلیکون) با استفاده از ترموسایکرها **real-time RT-PCR** تشخیص داده می شود. همه اجزای مورد استفاده در روش های متداول **RT-PCR** در **real-time RT-PCR** نیز وجود دارد اما علاوه بر آنها یک گزارش گر فلورسنسی مثل یک رنگ متصل شونده به **DNA** یا یک پرایمر اولیگونوکلوئوتیدی فلورسنت نیز در واکنش حضور دارند. گزارش گر فلورسنسی تنها زمانی نور فلورسنس را ساطع می کند که محصول، تکثیر شده باشد، لذا افزایش سیگنال فلورسنس ثبت شده نسبت مستقیمی با افزایش محصول در واکنش دارد. هرچه غلظت الگو بیشتر باشد، افزایش معنی دار فلورسنس، زودتر مشاهده می شود. شدت سیگنال فلورسنس در مراحل اولیه تکثیر به طور عمومی ۳ تا ۱۵ چرخه اول تغییر نمی کند یا تغییرات بسیار جزئی نشان می دهد و این میزان فلورسنس، فلورسنس زمینه یا خط پایه در نظر گرفته می شود. آستانه فلورسنس را باید کمی بالاتر از این خط پایه در نظر بگیریم، در این حالت افزایش معنی داری در شدت فلورسنس در دستگاه ثبت خواهد شد زیرا شدت سیگنال، بالاتر از میزان آستانه بوده است، که به آن "چرخه آستانه" یا **C_T** می گویند. با دانستن میزان **C_T** برای یک واکنش و رسم یک منحنی استاندارد غلظت **cDNA** شدت فلورسنس در مقابل غلظت **cDNA**، می توان به غلظت الگوی اولیه پی برد (47).

قبل از انجام آزمایش Real-time \PCR بر روی نمونه های مورد مطالعه می بایست کارایی پرایمر های مورد استفاده سنجیده شود چرا که نزدیک بودن کارایی پرایمرها در جواب نهایی بسیار مهم است.

مواد و وسائل مورد نیاز :

۱) کیت (TaKaRa, Japan) Premix Ex Taq TM (Probe qPCR), Bulk محتوی کیت شامل موارد زیر است: رنگ ROX Reference Dye به منظور نرمال سازی سیگنال ها در بین چاهک ها بکار می رود. خود بافر شامل: TaKaRa Ex Taq HS, dNTP Mixture, Mg²⁺, and Tli RNase H: است.

۲) پرایمر Forward باغلظت 10pmol/μl

۳) پرایمر Reverse با غلظت 10pmol/μl

۴) نمونه cDNA افراد گروه کنترل

۵) آب DEPC

۶) سمپلر متغیر (Eppendorf, Germany)

۷) دستگاه ABI 7500 (Applied Biosystem) Real time PCR

شکل (۳-۳). نمودار تعیین کارایی برای پرایمرهای NR2A, NR2B

برای استفاده از این کیت در دستگاه Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR

System طبق جدول (۲-۳) زیر عمل گردید.

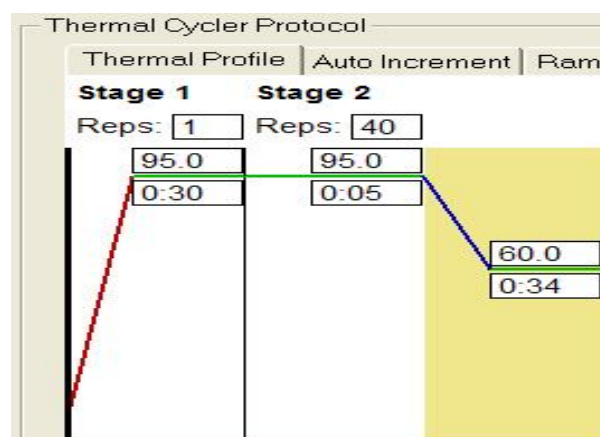
Reagent	Volume
Premix Ex Taq (2X) (Probe qPCR), Bulk	10μl
PCR Forward Primer (10 μM)	0.4μl
PCR Reverse Primer (10 μM)	0.4μl

TaqMan® probe	0.8µl
ROX Reference Dye	0.04µl
Template	2 µl
dH2O (sterile distilled water)	6.36 µl

لازم به توضیح است که حجم نهایی واکنش ۲۰ میکرو لیتر بود.

برنامه دمایی به دستگاه Real-time بصورت زیر داده شد :

۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتیگراد به عنوان اولین گام برای دناتوراسیون و پس از ۴۰ سیکل در ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ ثانیه و ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۴ ثانیه.



۳-۶-۲. انجام تکنیک Real time PCR بر روی نمونه های مورد مطالعه :

بعد از مطمئن شدن از اینکه کارایی پرایمر ها در یک محدوده طبیعی و نزدیک به هم قرار دارد، بر روی نمونه های cDNA سنتز شده طبق شرایطی که در بالا توضیح داده شد ۲ بار، Real-time انجام گرفت و برای نمونه های که در آنها تغییرات زیادی در بین جواب اول و دوم دیده می شد دوباره آزمایش را تکرار گردید.

۱- با توجه به Ct(Cycle threshold) های به دست آمده برای نمونه های مورد مطالعه و بسته به اینکه کارائی پرایمرها چگونه باشد از روشهای آنالیز Pffafl یا Livak استفاده خواهد گردید.

Livak Formula(37):

$$\Delta CT(\text{test}) = CT(\text{protamin, test}) - CT(\text{ref, test})$$

$$\Delta CT(\text{calibrator}) = CT(\text{protamin, calibrator}) - CT(\text{ref, calibrator})$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT(\text{test}) - \Delta CT(\text{calibrator})$$

$$\text{Expression ratio (folds)} = 2^{-\Delta\Delta C}$$

استفاده از این فرمول زمانی کاربرد دارد که کارائی پرایمرهای ژن هدف و کنترل ۱۰۰ درصد باشد.

Pffafl Formula(44):

$$\text{Expression ratio (folds)} = \frac{(E_{\text{protamin}})^{(CT(\text{protamin, calibrator}) - CT(\text{protamin, test}))}}{(E_{\text{ref}})^{(CT(\text{ref, calibrator}) - CT(\text{ref, test}))}}$$

استفاده از این فرمول زمانی کاربرد دارد که کارائی پرایمرهای ژن هدف و کنترل با هم متفاوت بوده ولی به هم نزدیک باشند. استفاده از این فرمول زمانی کاربرد دارد که کارائی پرایمرهای ژن هدف و کنترل با هم متفاوت بوده ولی به هم نزدیک باشند. معمولاً به منظور تفسیر نتایج اگر میزان تغییر بیان ژنها و یا به عبارتی expression ratio fold عدد ۱ یا اعداد نزدیک آن باشد بیانگر عدم تغییر در بیان ژنهای نمونه های بیمار نسبت به کنترل، و اگر بالای و پایین ۱ که تفاوت معنی دار با ۱ دارد باشد به ترتیب بیانگر افزایش و کاهش میزان بیان ژن مورد نظر در نمونه های بیمار نسبت به کنترل خواهد بود.

فصل چهارم

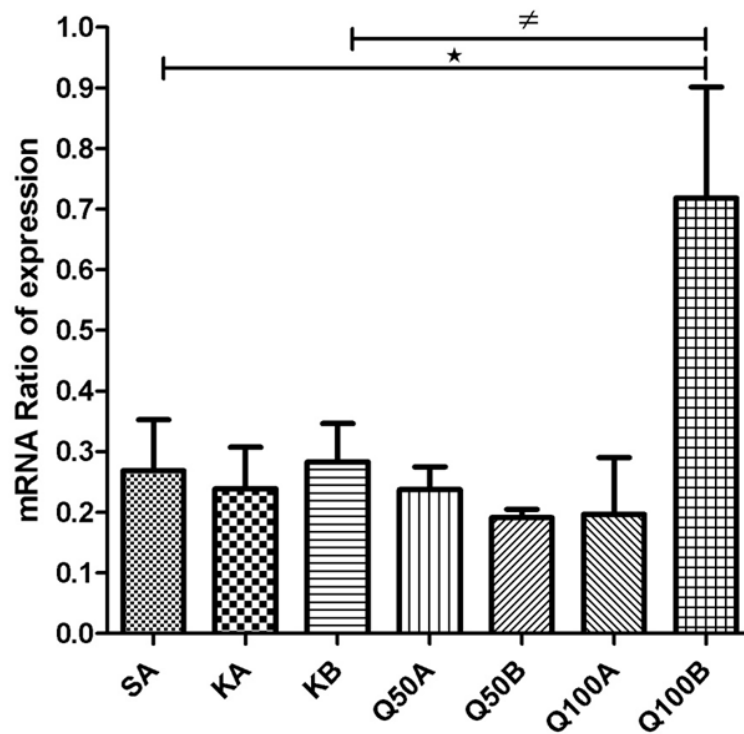
یافته‌ها و نتایج

نتایج این تحقیق نشان داد که تفاوت معنی داری در میزان بیان ژن ساب یونیت NR2A در گروه کنترل (این گروه فقط سالین دریافت کرده بودند) که ۲ ساعت و هفت روز پس از تزریق کاینیک اسید کشته شده بودند در هیپوکامپ وجود ندارد.

در مورد میزان بیان این ژن در گروههایی که کاینیک اسید دریافت کرده بودند تفاوت معنی دار با گروه کنترل وجود نداشت (در هر دو گروههایی که دوساعت و ۷ روز پس از تزریق کاینیک اسید کشته شده بودند).

در گروههایی که کوئرستین با غلظت ۵۰ mg/kg دریافت کرده بودند نیز تفاوت معنی دار در میزان بیان ژن NR2A نسبت به گروه کنترل وجود نداشت (در هر دو گروههایی که دوساعت و ۷ روز پس از تزریق کاینیک اسید کشته شده بودند).

اما در گروهی که کوئرستین با غلظت ۱۰۰ mg/kg دریافت کرده بودند به طور قابل توجهی افزایش سطح بیان ژن ساب یونیت NR2A نسبت به گروه کنترل دیده شد (گروهی که ۷ روز پس از تزریق کاینیک اسید کشته شده بودند).



اثر کوئرستین بر نسبت mRNA مربوط به بیان NR2A در تشنج ناشی کاینیک اسید در هیپوکامپ موش

داده ها بیان می شوند با $P < 0.001$ *** در مقایسه با گروه کنترل و با $P < 0.001$ ### در مقایسه

با گروه کاینیک اسید پس از ۷ روز

A: ۲ ساعت پس از تزریق کاینیک اسید B: ۷ روز پس از تزریق کاینیک اسید

درمورد میزان بیان ژن ساب یونیت NR2B در گروه کنترل (این گروه فقط سالین دریافت کرده بودند) و

۲ ساعت و هفت روز پس از تزریق کاینیک اسید کشته شده بودند در هیپوکامپ وجود نداشت.

در مورد میزان بیان ژن NR2B در گروههایی که کاینیک اسید دریافت کرده بودند تفاوت معنی دار با

گروه کنترل وجود نداشت (در هر دو گروههایی که دو ساعت و ۷ روز پس از تزریق کاینیک اسید کشته

شده بودند).

در گروههایی که کوئرستین با غلظت ۵۰ mg/kg دریافت کرده بودند نیز تفاوت معنی دار در میزان بیان

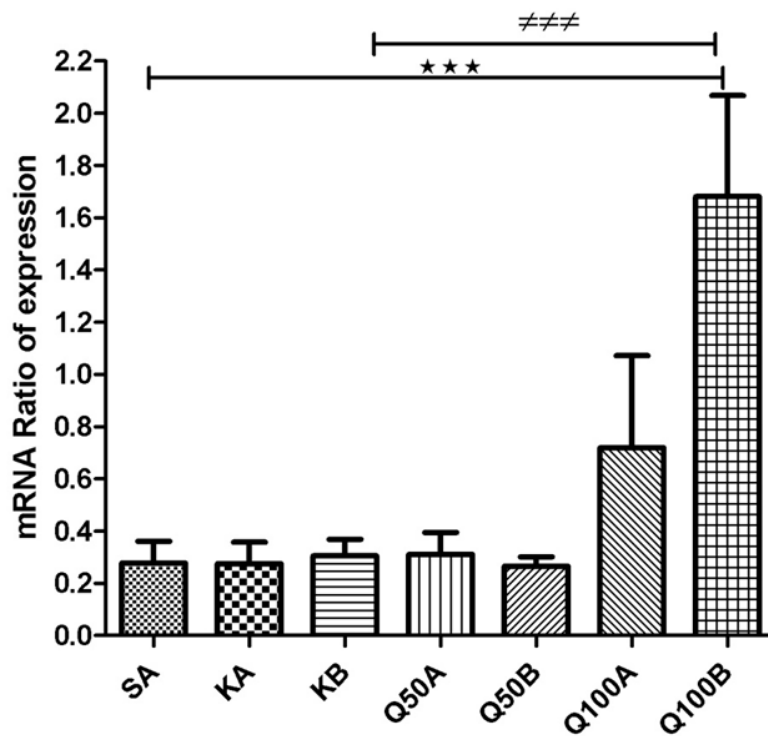
ژن NR2B نسبت به گروه کنترل وجود نداشت (در هر دو گروههایی که دو ساعت و ۷ روز پس از تزریق

کاینیک اسید کشته شده بودند).

اما در گروهی که کوئرستین با غلظت ۱۰۰ mg/kg دریافت کرده بودند به طور قابل توجهی افزایش

سطح بیان ژن ساب یونیت NR2A نسبت به گروه کنترل دیده شد (گروهی که ۷ روز پس از تزریق

کاینیک اسید کشته شده بودند).



اثر کوئرستین بر نسبت *mRNA* مربوط به بیان *NR2B* در تشنج ناشی کاینیک اسید در هیپوکامپ موش.

داده ها بیان می شوند با $P < 0.05$ * $\pm SEM$. در مقایسه با گروه کنترل و با $P < 0.05$ # در

مقیسه با گروه کاینیک اسید پس از ۷ روز

A: ۲ ساعت پس از تزریق کاینیک اسید B: ۷ روز پس از تزریق کاینیک اسید

فصل پنجم

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه، تغییر قابل توجهی در بیان ژن **NR2A** و **NR2B** زیرواحدهای گیرنده های **NMDA** در گروه **KA** نسبت به شاهد، ۲ ساعت یا ۷ روز پس از تزریق **KA** دیده نشد

قبل از انجام درمان کوئرتستین (۱۰۰ میلی گرم / کیلوگرم) ۷ روز پس از تجویز **KA** بیان ژن **NR2A** و زیر واحد **NR2B** گیرندههای گلوتامات افزایش یافته است

عنوان مطالعات قبلی ما فعالیت های ضد تشنج و اثرات مهارى کورستین بر روی پراکسیداسیون لیپیدی (۴۸) می باشد، ما هر گونه تغییر تحت بالینی ناشی از **KA** را در مطالعه آن استفاده کردیم

ممکن است که کورستین نقش مهمی در **LTP** (long-term potentiation) و شکل پذیری سیناپسی داشته باشد. در بیماران مبتلا به دیسپلازی کورتیکال کانونی مرتبط با صرع، بیان **mRNA GluR1** در هر دو مورد دیسپلاستیک و سلول های عصبی هتروتوپ کاهش می یابد. علاوه بر این، بیان **mRNA NR2A** و **NR2B** کاهش یافته است و دیسپلاستیک در مقایسه با هتروتوپ و نوروں هر می افزایش یافته است. (۴۹)

گزارش متناقض در خصوص بیان سطح هیپوکامپ **AMPA** و **mRNA NMDA** در مطالعات انسانی و برخی از حیوانات وجود دارد. سطح **mRNA** ژن گیرنده های **NMDA** و **AMPA** در اسکروز انسان (**HS**) و غیر **HS** نسبت به هیپوکامپوس مغز افروخته افزایش یافته است. بنابراین، پیشنهاد شد که این مدل حیوانی مناسب برای **HS** بشر و بیماران غیر **HS** نیست (۵۰)

با این حال، یافته شد که زیر واحد گیرنده گلوتامات هیپوکامپ با از دست دادن سلول های عصبی در بیماران مبتلا به اسکروز **TLE** با **Ammon's horn sclerosis** کاهش می یابد (۵۱)

یکی از دلایل مهم برای نتایج مخالف موجود در بیان این واقعیت این است که جمعیت مطالعه (حیوانات یا انسان) و مدل تشنج و اعمال سم و روش برای تشخیص تغییرات مختلف است. همچنین، برخی از مطالعات مربوط به **mRNA** و دیگر مربوط به تغییرات پروتئین است بنابراین، مقایسه آنها دشوار است

تشنج ناشی از سم کزاز و یا **flurothyl** مراحل کودکی مرتبط با تنظیم بیان **NR2A** و پروتئین **PSD95** در هیپوکامپ و نئوکورتکس می باشد. موضوع جالب در این مطالعه این است که روز پس از زایمان و تعداد تشنج در شدت وقوع پایین تنظیم ژن **NR2A** مهم بودند با این حال، تشنج در موش بالغ می تواند بیان **NR2A** را تغییر ندهد. پیشنهاد شده است که مکانیسم جبرانی مغز در حال توسعه باعث کاهش تحریک پذیری سلول های عصبی در برابر بیش فعالی از تکرار تشنج میشود از سوی دیگر، نقش گیرنده های **NMDA** در یادگیری و حافظه تایید شد و کاهش گیرنده های **NMDA** می تواند بلوغ سیناپس را تخریب کند (۵۲)

در موشهای بدون گیرنده های **NMDA**، یادگیری و حافظه فضایی دچار اختلال شد (۵۳)

مدل کیندلینگ الکتریکی صرع در موش صحرایی قادر نیستند بروز گیرنده های **NMDA (NMDAR1)**.

NR2A و **NR2B** در هیپوکامپ پس از ۲۸ روز از آخرین تشنج تغییر دهند (۵۴)

نشان داده شد که سطح **NR2B / PSD-95 mRNA** و پروتئین در موش **KA** که تحت درمان قرار گرفتند ۲ هفته پس از صرع نسبت به گروه نرمال تغییر نکرده. اما، ۴ و ۶ هفته پس از صرع نه تنها این عبارت کاهش یافت بلکه یادگیری و حافظه فضایی دچار اختلال شد (۵۵)

علاوه بر این، افزایش بیان **NR2B** در **forebrain** بهبود عملکرد یادگیری و حافظه را در مغز موشهای مسن سبب شد (۵۶)

Kinesin از خانواده پروتئین موتور ۱۷ (**KIF17**) یک ناقل گیرنده **NMDA** زیرواحد **NR2B** است. نشان داده شد که این پروتئین برای حفظ سطح **NR2B / NR2A** برای فرایند حافظه از جمله اکتساب، تثبیت و بازیابی لازم است

همچنین، روشن است که **NR2B** برای حفظ سطح **NR2A** در نورون ضروری است و به موازات این مطالعه، میکرو **RNA** ها (**miRNA**) فلج تداخلی **RNA** و روش های دارویی، از دست دادن عملکرد **NR2B** در نتیجه کاهش سطح **NR2A** از طریق افزایش در افت پروتئازوم واسطه **NR2A** را نشان داده شده است (۵۷)

در مطابقت با آن گزارش، ما مشاهده کردیم که کورستین ۱۰۰ میلی گرم / کیلوگرم می تواند بیان ژن زیر واحد گیرنده **NMDA** را افزایش دهد که این ممکن است توضیح دهد کورستین قبل از تشنج می تواند اثر افزایش در شکل پذیری سیناپسی و حافظه داشته باشد

این فرضیه ممکن است از این شواهد که کورستین باعث بهبود حافظه در موش می شود پشتیبانی کند

علاوه بر این، کورستین است اثر مهاری بر علیه **PTZ** در موش صحرایی فروخته دارد و از آنجا که، **PTZ**، مسدودکننده انتخابی کانال کلرید همراه با رسپتور کمپلکس گابا می باشد

پیشنهاد شده است که کورستین ممکن است اثر تعدیلی بر روی سیستم گابا داشته باشد (نصیری اصل و همکاران، ۲۰۱۳). کورستین در ۳۰ میکرومولار می تواند **$\alpha 1\beta 1\gamma 2$ GABA_A** و گیرنده **p1 GABAc** در تخمک **Xenopus laevis** مهار کند (58).

گیرنده های **GABA_A** غیر حساس به آنتاگونیست رقابتی **GABA** هستند و تمایل پایین به تعدیل کننده آلوستریک گابا مانند بنزودیازپین و باربیتورات دارند.

علاوه بر این، نشان داده که آنتاگونیست گیرنده های **GABA_Ap1** وابسته به دوز کورستین از طریق یک مکانیزم آلوستریک مستقل از اکسیداسیون و کاهش و اسید اسکورییک می تواند این اثر را مهار کنند (59)

در این راستا، کوئرتستین انتشار گلوتامات در **synaptosomes cerebrocortical** موش را مهار کرده است. به نظر می رسد که کاهش در ورود **Ca²⁺** از طریق کانال های **Ca²⁺** + پره سیناپستیک وابسته به ولتاژ (**VDCCs**) و سرکوب فعالیت های **PKC** و **PKA** ممکن است در این واقعه ای نقش داشته باشد (۶۰)

پس از آن، ما باید به مکانیسم های دیگر که ممکن است شامل اثرات تعدیلی کورستین در انتقال های عصبی مغز و شکل پذیری سیناپسی باشد را در نظر بگیریم. با این حال، مطالعات مولکولی در جهت پیدا کردن اثر این تغییرات در بیان ژنها در مسیرهای دیگر انتقال سیگنال از شکل پذیری سیناپسی پیشنهاد شده است.

والپروئیک اسید به عنوان یک تثبیت کننده خلق و خو و ضد تشنج و لیتیوم به عنوان یک مواد مخدر تثبیت کننده خلق و خوی اثرات محافظت نورونی دارند. هر دوی آنها می تواند مسیر سیگنالینگ **PI3-K / AKT** را

فعال کنند. پروتئین محافظت نورونی، از جمله **Hsp 70, pBcl-2 and p-Erk1/2** را القا کنند و **GSK-3** را غیرفعال کنند. (۶۱)

در این مطالعه، ما تغییرات زیر واحد گیرنده های **NMDA** و کورستین را در مدل صرع **KA** در موش را پیگیری کردیم این تغییرات لزوماً به معنی تغییرات در پروتئین کاربردی نیست. با این حال، مطالعات بعدی نیاز به ادامه مکانیسم مولکولی کورستین در برابر نوروتوکسیسته ناشی از **KA** می باشد

Abstract

In recent years, flavonoids are known with an important biological effects. Quercetin as a flavonoid, has several pharmacological properties including anti-inflammatory, and neuroprotective activities and anticonvulsant effects. The aim of this study was to find the role of quercetin on gene expression of ionotropic glutamate receptor subunits and in kainic acid (KA)-induced seizure in mice. Quercetin (50 and 100 mg/kg, i.p.) was given 7 days before administration of KA. Pretreatment of quercetin (100 mg/kg) for 7 days could significantly enhance the gene expression of NR2A and NR2B subunits of NMDA only 7 day after KA administration compared to control and KA groups in the hippocampus of mice.. Increment of gene expression of subunits of NMDA receptors by quercetin might explain protective effect of it on synaptic plasticity and memory. However, further molecular studies needs to evaluate the effects of quercetin against neurotoxicity of KA.

Keywords: Quercetin, Kainic acid, , NMDA receptors,

فصل ششم

فهرست منابع

1- Greenberg DA, Aminoff MJ, Simon RP (2012). Clinical neurology (8th edition). McGraw-Hill/Appleton & Lange 8: 271-280.

2-Yuri Bozzi, Mark Dunleavy, and David C. Henshall (2011). Cell signaling underlying epileptic behavior. 02 August 2011 doi: 10.3389/fnbeh.2011.00045

3-DeNinno, M. P., Schoenleber, R., Perner, R. J., Lijewski, L., Asin, K. E., Britton, D. R., Mackenzie, R., and Keabian, J. W. (1991). Synthesis and dopa-minergic activity of 3-substituted 1-(aminomethyl)-3,4-dihydro- 5,6-dihydroxy-1H-2-benzopyrans: characterization of an auxiliary binding region in the D1 receptor. J. Med. Chem. 34, 2561–2569.

4-Barnes, N. M., and Sharp, T. (1999). A review of central 5-HT receptors and their function. Neuropharmacology 38, 1083–1152.

5-Tripathi, P. P., Di Giovannantonio, L. G., Viegi, A., Wurst, W., Simeone, A., and Bozzi, Y. (2008). Serotonin hyperinnervation abolishes seizure susceptibility in Otx2 conditional mutant mice. J. Neurosci. 28, 9271–9276.

6-Morgan, J. I., Cohen, D. R., Hempstead, J. L., and Curran, T. (1987). Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. Science 237, 192–197. Morgan, J. I., and Curran, T. (1989). Stimulus-transcription coupling in neurons: role of cellular immediate-early genes. Trends Neurosci. 12, 459–462.

7-Morgan, J. I., and Curran, T. (1991a). Proto-oncogene transcription factors and epilepsy. Trends Pharmacol. Sci. 12, 343–349. Morgan, J. I., and Curran, T.

(1991b). Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annu. Rev. Neurosci.* 14, 421–451.

8-Smeyne, R. J., Schilling, K., Robertson, L., Luk, D., Oberdick, J., Curran, T., and Morgan, J. I. (1992). fos-lacZ trans-genic mice: mapping sites of gene induction in the central nervous system. *Neuron* 8, 13–23.

9-Barone, P., Morelli, M., Ciccarelli, G., Cozzolino, A., Dejoanna, G., Campanella, G., and Dichiaro, G. (1993). Expression of c-fos protein in the experimental epilepsy induced by pilocarpine. *Synapse* 14, 1–9. 10-West et al., 2002; Flavell and Greenberg, 2008

11-BartBomiej Pochwat, Gabriel Nowak, and Bernadeta Szewczyk.2015. Relationship between Zinc (Zn²⁺) and Glutamate Receptors in

the Processes Underlying Neurodegeneration. Hindawi Publishing Corporation

Neural Plasticity Volume 2015, Article ID 591563, 9 pages

12-Rampon et al., 2000,Tang et al., 1999 and Tsien et al., 1996)

13-Carroll and Zukin, 2002 and Dingledine et al., 1999

14-Lau and Zukin, 2007, Monyer et al., 1994 and Watanabe et al., 1993

15- Bourtchuladze et al., 1994, Impey et al., 1998, Mizuno et al., 2002 and Pittenger et al., 200216- Brooks-Kayal AR, Raol YH, Russek SJ. Alteration of epileptogenesis genes. *Neurotherapeutics* 2009; 6(2): 312-318.

17-Lerma J, Marques JM. Kainate receptors in health and disease. *Neuron.* 2013;80(2):292-311

18-Flores-Soto ME, Chaparro-Huerta V, Escoto-Delgadillo M, Vazquez-Valls E, González-Castañeda RE, Beas-Zarate C. Structure and function of NMDA-type glutamate receptor subunits. *Neurologia.* 2012;27(5):301-10.

19-Chen Q, He S, Hu XL, Yu J, Zhou Y, Zheng J, Zhang S, Zhang C, Duan WH, Xiong ZQ. Differential roles of NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors in activity-

dependent brain-derived neurotrophic factor gene regulation and limbic epileptogenesis. *J Neurosci.* 2007;27(3):542-52.

20-Mony L, Kew JN, Gunthorpe MJ, Paoletti P. Allosteric modulators of NR2B-containing NMDA receptors: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Br J Pharmacol.* 2009 Aug;157(8):1301-17.

21-Ama'lia PM, Possa MN, Augusto MC, Francisca LS. Quercetin prevents oxidative stress in cirrhotic rats. *Digestive Disease and Science* 2007; 52: 2616–2621.

22-Harwood M, Danielewska-Nikiel B, Borzelleca JF, Flamm GW, Williams GM, Lines TC. A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of in vivo toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. *Food and Chemical Toxicology* 2007;45: 2179–2205

23-Chen TJ, Jeng JY, Lin CW, Wu CY, Chen YC. Quercetin inhibition of ROS-dependent and independent apoptosis in rat glioma C6 cells. *Toxicology* 2006; 223: 113–126.

24-Bhattaram VA, Geraefe U, Kohlert C, Veit M, Derendorf H. Pharmacokinetics and bioavailability of herbal medicinal product. *Phytomedicine* 2002; 9: 1–33.

25-Ren SC, Suo QF, Du WT, Pan H, Yang MM, Wang RH, et al. (2010). Quercetin permeability across blood brain barrier and its effect on the viability of U251 cells. *Journal of Sichuan Medical Science* 41:751–754, 759

26-Ossola B, Kääriäinen TM, Männistö PT. (2009). The multiple faces of quercetin in neuroprotection. *Expert Opinion on Drug Safety* 8: 397–409.

27-Li JM, Zeng YJ, Peng F, Li L, Yang TH, Hong Z, Lei D, Chen Z, and Zhou D. Aberrant glutamate receptor 5 expression in temporal lobe epilepsy lesions. *Brain Res* 2010; 1311, 166–174.

28-Kharlamov EA, Lepsveridze E, Meparishvili M, Solomonias RO, Lu B, Miller ER, Kelly KM, Mtchedlishvili Z. Alterations of GABA(A) and glutamate receptor

subunits and heat shock protein in rat hippocampus following traumatic brain injury and in posttraumatic epilepsy. *Epilepsy Res.* 2011;95(1-2):20-34.

29-Loddenkemper T, Talos DM, Cleary RT, Joseph A, Sánchez Fernández I, Alexopoulos A, Kotagal P, Najm I, Jensen FE. Subunit composition of glutamate and gamma-aminobutyric acid receptors in status epilepticus. *Epilepsy Res.* 2014;108(4):605-15.

30-Sánchez Fernández I, Loddenkemper T2. Subunit composition of neurotransmitter receptors in the immature and in the epileptic brain. *Biomed Res Int.* 2014;2014:301950.

31-Borska S, Chmielewska M, Wysocka T, Drag-Zalesinska M, Zabel M, Dziegiel P (2012). In vitro effect of quercetin on human gastric carcinoma: targeting cancer cells death and MDR. *Food Chem Toxicol* 50: 3375-3383.

32-Choi EJ, Chee KM, Lee BH. Anti- and prooxidant effects of chronic quercetin administration in rats. *Eur J Pharmacol* 2003;482: 281-285.

33-Huang J, Zhu M, Tao Y, Wang S, Chen J, Sun W, et al. Therapeutic properties of quercetin on mono sodium urate crystal-induced inflammation in rat. *J Pharm Pharmacol* 2012;64: 1119-1127.

34-Kim HS, Wannatung T, Lee S, Yang WK, Chung SH, Lim JS, et al. Quercetin enhances hypoxia mediated apoptosis via direct inhibition of AMPK activity in HCT116 colon cancer. *Apoptosis* 2012; 17: 938-949.

35- Liu CM, Sun YZ, Sun JM, Ma JQ, Cheng C. Protective role of quercetin against lead-induced inflammatory response in rat kidney through the ROS-mediated MAPKs and NF- B pathway. *Biochimica et Biophysica Acta* 2012; 1820: 1693-1703.

36-Patir H, Sarada SK, Singh S, Mathew T, Singh B, Bansal A. Quercetin as a prophylactic measure against high altitude cerebral edema. *Free Radic Biol Med* 2012; 53: 659-668

- 37-Dajas F, Rivera F, Blasina F, Arredondo F, Echeverry C, Lafon L, Morquio A, Heizen H. Cell culture protection and in vivo neuroprotective capacity of flavonoids. *Neurotox Res* 2003; 5: 425-432.
- 38-Ong CS, Tran E, Nguyen TT, Ong CK, Lee SK, Lee JJ, Ng CP, Leong C, Huynh H. Quercetin-induced growth inhibition and cell death in nasopharyngeal carcinoma cells are associated with increase in Bad and hypophosphorylated retinoblastoma expressions. *Oncol Rep* 2004; 11: 727-733.
- 39-Williams RJ, Spencer JP, Rice-Evans C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radic Biol Med* 2004;36: 838-849.
- 40-Skibola, Smith. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radic Biol Med* 2000; 29: 375-83.
- 41-Hollman PC, Katan MB. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food Chem Toxicol* 1999; 37: 937-42.
- 42-Joshi D, Naidu PS, Singh A, Kulkarni SK (2005). Protective effect of quercetin on alcohol abstinence induced anxiety and convulsions. *J Med Food* 8: 392-396.
- 43-Ossola B, Kääräinen TM, Raasmaja A, Männistö PT. (2008). Time-dependent protective and harmful effects of quercetin on 6-OHDA-induced toxicity in neuronal SH-SY5Y cells. *Toxicology* 250: 1-8.
- 44-. Nassiri-Asl M, Moghbelinejad S, Abbasi E, Yonesi F, Haghighi MR, Lotfizadeh M, Bazahang P. Effects of quercetin on oxidative stress and memory retrieval in kindled rats. *Epilepsy Behav* 2013;;3:151-155.
- 45-. Nassiri-Asl M, Hajiali F, Taghiloo M, Abbasi E, Mohseni F, Yousefi F. Comparison between the effects of quercetin on seizure threshold in acute and chronic seizure models. *Toxicol Ind Health*. 2014 Jan 17.
- 46- Pesce CM 1987. The testicular biopsy in the evaluation of male infertility. *Semin Diagn Pathol*.4(4):264 274.

تهران. ویرایش دوم، PCR. زرینی، غلامرضا، میرزایی، سیدعباس، الهیان، فاطمه ۱۳۸۹. واکنش زنجیره ای پلیمراز- 47
، انتشارات آیت ۲۵۹-۲۸۶.

48- Nassiri-Asl et al., 2013; Nassiri-Asl et al., 2015

49- Crino PB, Duhaime AC, Baltuch G, White R. Differential expression of glutamate and GABA-A receptor subunit mRNA in cortical dysplasia. *Neurology*. 2001 Apr 10;56(7):906-13.

50- Mathern GW, Pretorius JK, Leite JP, Kornblum HI, Mendoza D, Lozada A, Bertram EH 3rd. Hippocampal AMPA and NMDA mRNA levels and subunit immunoreactivity in human temporal lobe epilepsy patients and a rodent model of chronic mesial limbic epilepsy. *Epilepsy Res*. 1998 Sep;32(1-2):154-71.

51- Blümcke I, Beck H, Scheffler B, Hof PR, Morrison JH, Wolf HK, Schramm J, Elger CE, Wiestler OD. Altered distribution of the alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate receptor subunit GluR2(4) and the N-methyl-D-aspartate receptor subunit NMDAR1 in the hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy. *Acta Neuropathol*. 1996 Dec;92(6):576-87.

52- Swann JW, Le JT, Lee CL. Recurrent seizures and the molecular maturation of hippocampal and neocortical glutamatergic synapses. *Dev Neurosci*. 2007;29(1-2):168-78.

53-Tsien JZ, Huerta PT, Tonegawa S. The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell*. 1996 Dec 27;87(7):1327-38.

54-Kraus JE, McNamara JO. Measurement of NMDA receptor protein subunits in discrete hippocampal regions of kindled animals. *Brain Res Mol Brain Res*. 1998 Oct 30;61(1-2):114-20.

55-Sun QJ, Duan RS, Wang AH, Shang W, Zhang T, Zhang XQ, Chi ZF. Alterations of NR2B and PSD-95 expression in hippocampus of kainic acid-exposed rats with behavioural deficits. *Behav Brain Res*. 2009 Aug 12;201(2):292-9.

56-Cao X, Cui Z, Feng R, Tang YP, Qin Z, Mei B, Tsien JZ. Maintenance of superior learning and memory function in NR2B transgenic mice during ageing. *Eur J Neurosci*. 2007 Mar;25(6):1815-22.

57-Yin X, Takei Y, Kido MA, Hirokawa N. Molecular motor KIF17 is fundamental for memory and learning via differential support of synaptic NR2A/2B levels. *Neuron*. 2011 Apr 28;70(2):310-25.

Kim MJ, Dunah AW, Wang YT, Sheng M. Differential roles of NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors in Ras-ERK signaling and AMPA receptor trafficking. *Neuron*. 2005 Jun 2;46(5):745-60.

58-Goutman JD, Waxemberg MD, Doñate-Oliver F, Pomata PE, Calvo DJ. Flavonoid modulation of ionic currents mediated by GABA(A) and GABA(C) receptors. *Eur J Pharmacol*. 2003 Feb 14;461(2-3):79-87.

59-Calero CI, Beltrán González AN, Gasulla J, Alvarez S, Evelson P, Calvo DJ. Quercetin antagonism of GABA_A α_1 receptors is prevented by ascorbic acid through a redox-independent mechanism. *Eur J Pharmacol*. 2013;714(1-3):274-80.

60-Lu CW, Lin TY, Wang SJ. Quercetin inhibits depolarization-evoked glutamate release in nerve terminals from rat cerebral cortex. *Neurotoxicology*. 2013 Dec;39:1-9.

61-Chuang DM. The antiapoptotic actions of mood stabilizers: molecular mechanisms and therapeutic potentials. *Ann N Y Acad Sci*. 2005 Aug;1053:195-204.

Pan T, Li X, Xie W, Jankovic J, Le W. Valproic acid-mediated Hsp70 induction and anti-apoptotic neuroprotection in SH-SY5Y cells. *FEBS Lett*. 2005 Dec 19;579(30):6716-20.

